



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ

**Специјалистички студии за дипломиран лаборант по медицинска
лабораториска дијагностика специјализиран за работа
во микробиолошка лабораторија**

Хепатитис Б и хепатитис Ц вирусни инфекции

- *можности за современа микробиолошка дијагноза*
- *микробиолошка дијагноза и инциденца во Штип*

Ментор

Проф. д-р Васо Талески

Кандидат

Ивана Димиќ

Број на индекс 15581

Штип, 2017

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

anti-HBc - Антитело анти-HBc

anti-HBs - Антитело анти-HBs

anti-HBe - Антитело анти-HBe

ELFA - Ензимска флуоресцентна имуноаналитичка техника

ELISA - Имуноензимска метода

HBcAg - Хепатитис Б нуклеарен антиген

HbeAg - Хепатитис Б е-антиген

HbsAg - Хепатитис Б површински антиген

IgG - Имуноглобулин Г

IgM - Имуноглобулин М

PCR - Полимераза верижна реакција

RFV - Релативна флуоресцентна вредност

SPR - Цврста приклучна фаза

АЛТ - Аланин-аминотрансфераза

АСАТ - Аспартат-аминотрансфераза

аф - Алкална фосфатаза

ГГТ - Гама глутамил транспептидаза

ДНК - Дезоксирибонуклеинска киселина

РНК - Рибонуклеинска киселина

СЗО - Светска здравствена организација

ХБВ - Хепатитис Б вирус

ХЦВ - Хепатитис Ц вирус

БЛАГОДАРНОСТ

Голема благодарност и почит би сакала да изразам до менторот на мојот специјалистички труд, проф. д-р Васо Талески, за неговата несебична морална, стручна и професионална посветеност за изработката на овој труд, за укажаните совети, помош, поука и сугестии во текот на изработката.

Воедно би сакала да изразам благодарност и до прим. д-р Марија Димитрова спец. микробиолог, како и до дипломиран лаборант Виолета Поповска, кои ми помогнаа со обезбедување на потребните податоци за комплетирање на трудот.

Комисија за оценка и одбрана

Претседател: проф. д-р Милка Здравковска
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Член: проф. д-р Ѓорѓи Шуманов
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Член: проф. д-р Васо Талески
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Ментор: проф. д-р Васо Талески
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Датум на одбрана: _____

Содржина

1. ВОВЕД.....	8
1.1. Хепатитис Б вирус	8
1.1.1. Структура	8
1.1.2. Репликација на вирусот	9
1.1.3. Трансмисија	10
1.1.4. Патогенеза.....	12
1.1.5. Клинички манифестации	12
1.1.6. Лекување	14
1.1.7. Епидемиологија.....	14
1.1.8. Заштита од ХБВ	15
1.2. Хепатитис Ц вирус	16
1.2.1. Структура.....	16
1.2.2. Репликација	17
1.2.3. Трансмисија	17
1.2.4. Патогенеза.....	18
1.2.6. Лекување	20
1.2.7. Епидемиологија.....	20
2. ЦЕЛ НА ТРУДОТ.....	21
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА.....	22
4. ТЕСТОВИ ЗА ДЕТЕКЦИЈА НА ХЕПАТИТИС Б И ХЕПАТИТИС Ц.....	23
4.1. Тестови за детекција на хепатитис Б	23
4.2. ТЕСТОВИ ЗА ДОКАЖУВАЊЕ НА ХЕПАТИТИС Ц	30
4.3. Техника за откривање на HbsAg со VIDAS апарат.....	32
4.4. Техника за откривање на HbsAg и anti-HCV со брзи тестови	39
5. Полимераза верижна реакција (PCR)	44
6. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	49
7. ЗАКЛУЧОК.....	57
КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....	60

АПСТРАКТ

Хепатитис Б вирусот е еден од најмалите хумани патогени. Хепатитис Б вирусот е ДНК вирус со сложена структура и голема отпорност во надворешната средина. Вирусот ѝ припаѓа на фамилијата *Hepadnaviridae*.

Хепатитис Ц вирусот му припаѓа на семејството *Flaviviridae*. Тој е РНК вирус составен од единствената вретенеста РНК.

Во светот бројот на лица заболени од ХБВ и ХЦВ секојдневно се зголемува. Хепатитис Б вирусот и хепатитис Ц вирусот претставуваат вирусни заболувања кои го напаѓаат црниот дроб, се пренесуваат преку крв, плазма, сексуални односи и др. Вирусите хепатитис Б и хепатитис Ц се докажуваат со повеќе методи, најчесто со брзи тестови. Задолжителни потврдни техники се ELFA, PCR, IMMULITE и др. техники.

Ова истражување вклучува повеќе групи и тоа лица кои се јавиле на лекарски преглед поради некоја мачнина, крводарители, зависници од наркотични средства, затвореници. Испитаниците се поделени според возраст и пол. Испитувани се HbsAg со VIDAS апарат и антитела за ХЦВ инфекција.

Клучни зборови: *ELFA, HbsAg, PCR, ХБВ, ХЦВ, ХЦВ антитело*

ABSTRACT

Hepatitis B virus is one of the smallest human pathogens. Hepatitis B virus is DNA virus with complex structure and big resistance in environment. Virus belongs to family *Hepadnaviridae*.

Hepatitis C virus belongs to family *Flaviviridae*. It is RNA virus, with single RNA.

Number of persons infected by HBV and HCV is every day is increasing worldwide.

Hepatitis B virus and Hepatitis C virus cause viral infections of liver transmitted via blood, sexual activities, blood and plasma transfusions etc.

Both viruses are detecting with more methods such are: Rapid tests, confirmatory tests as ELFA, PCR, IMMULITE and others. This research includes more groups of persons who requested medical checkup, some nausea, voluntary blood donors, drug addicts, prisoners. Persons are divided by age and sex. HBs with VIDAS and anti HBc antibodies were detecting.

Key words: *ELFA, PCR, HBV, HCV, HCV antibody, HbsAg*

1. ВОВЕД

1.1. Хепатитис Б вирус

Хепатитис Б вирусот (HBV, ХБВ) е еден од најмалите хумани патогени вируси. ХБВ е ДНК вирус со сложена структура и голема отпорност во надворешната средина. Вирусот ѝ припаѓа на фамилијата *Hepadnaviridae*, во која се вклучени уште два хепатотропни вируси.¹

1.1.1. Структура

При ХБВ инфекција во крвта може да се докажат три различни честички, од кои доминантна форма се мали сферични честички со дијаметар од 22 nm, како и филамент со должина од 100 до 200 nm. И двата вида честички се составени од липид, протеин, јаглехидрат и не се инфективни. Овие честички имаат само површински антиген HbsAg. Третиот вид честички се Данеови честички, кои се комплетни вируси и само тие се инфективни форми на вирусот. Имаат дијаметар од 42 nm, кружна dsDNK, ДНК полимераза, HbcAg, HBeAg и HBsAg.² Комплетните вириони имаат липидна обвивка, идентична со обвивката на клетката во која се реплицирал вирусот и која содржи HbsAg. Во нуклеокапсидот се наоѓа протеинот HbcAg. Геномот е изграден од двоверижна и едноверижна ДНК молекула, кружно завиткана, со четири региони:³

S-генот одговара на површината на вирусот или протеинската обвивка (HbsAg);

C-генот одговара на регионот на јадрото, составен од нуклеокапсидни протеини кои содржат вирусна ДНК (HbcAg);

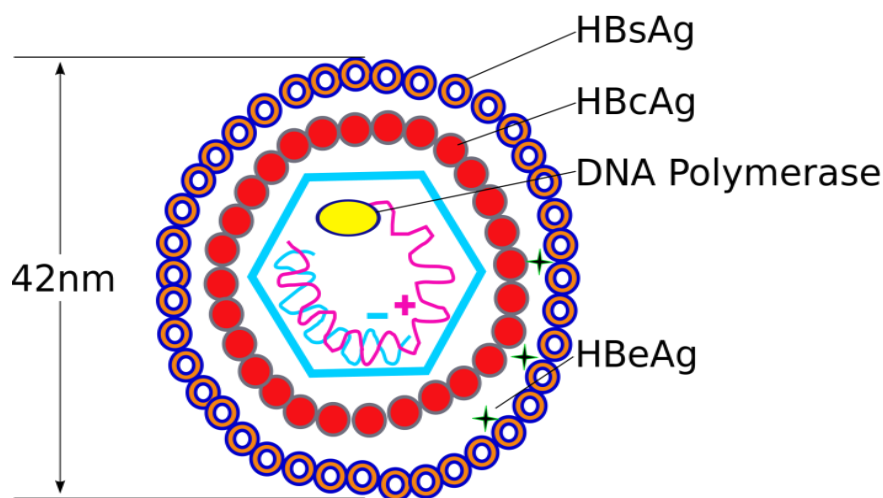
X-генот е составен од два протеина кои функционираат како активатори на транскрипцијата и може да игра улога во ХБВ карциногенезата;

P-генот одговара на вирусната полимераза која исто така учествува во реверзната транскриптивна активност есенцијална за ХБВ репликацијата.

¹ Инфективни болести, Љубомир Ивановски, 2007, 397- 405

² Medical Microbiology, D.Greenwood, R.Slack, J.Peutherer, M.Barer, 2010, 446

³ Медицинска микробиологија и паразитологија, спец. дел *Вирусологија*, Никола Пановски, Елена Трајковска-Докиќ, 2008, 248



Слика 1. Градба на ХБВ
Figure 1. Structure of Hepatitis-B virus

Двата S и C гени имаат спротиводен регион познат како preS (1+2) и preS наизменично. Во зависност од која страна е стартот на транскрипцијата може да се продуцираат различни протеини. На пример, S генот може да продуцира три различни протеини за обвивката, познати како голем, среден и мал, започнувајќи од транскрипцијата со preS1, preS2 или S генот наизменично. PreS1 и preS2 региони се најимуногените протеини од површните протеини. Рекомбинантот HBsAg, всушност, е вакцина која се користи за имунизација за да се постигне заштита против ХБВ.⁴

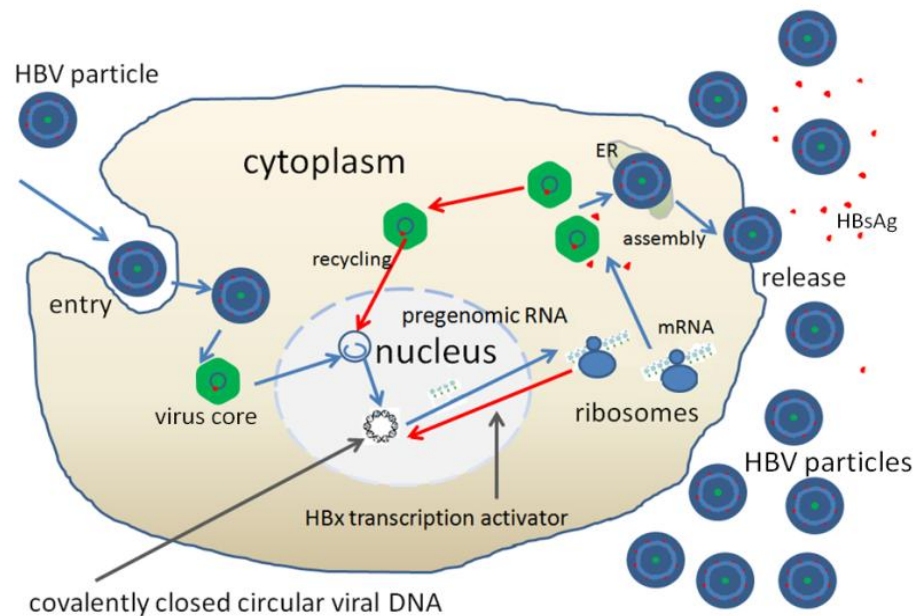
ХБВ е стабилен на ниска температура $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ повеќе десетици години, на $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ една недела, на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ надвор од организмот на домаќинот до еден час, делумно отпорен на ултравиолетови зраци, а осетлив е и на киселини, детергенти, натриум хипохлорит, температура од $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 1 минута.³

1.1.2. Репликација на вирусот

Репликацијата на вирусот започнува во јадрото на хепатоцитите, каде што вирусната ДНК е слободна, екстрахромозомска или интегрирана на разни места во рамките на хромозомите на домаќинот. Меѓутоа, интеграцијата не е од суштинско значење за вирусната репликација.² Сама по себе репликацијата не предизвикува релевантен патоген ефект. Имунолошкиот одговор на

⁴ Интерна медицина, том 1, проф. д-р Владимир Серафимоски, Скопје, 2003, 731

домаќинот кон ХБВ-инфекцијата е тој на кој се должи невообичаено големиот полиморфизам на ХБВ-хепатитисот. Природата и квалитетот на имунолошкиот одговор на ХБВ-инфекцијата веројатно подлежат на мултифакторен генетски детерминизам.¹



Слика 2. Репликација на ХБВ
Figure 2. Replication of Hepatitis-B virus

1.1.3. Трансмисија

Извор на инфекција е болен човек во акутна и хронична фаза на болеста со вирусоносите. Антигенот ХБс се наоѓа во серумот, плинката, спермата, вагиналниот секрет, телесните течности и во ткивата.⁵

Парентерална трансмисија

Пролонгираната и значајна виремија ја објаснува изразената контагиозност на инфекцијата и примарно парантералниот начин на трансмисија на ХБВ. Крвта и крвните деривати, инјекциите и другите медицински интервенции го зголемуваат ризикот од инфекција кај пациентите со политрансфузии, хемодијализа, корисниците на интравенски дроги и др. Кај одредени професии, како на пример медицински и парамедицински персонал,

⁵ Инфектологија со епидемиологија, проф. д-р Илија Трајков, 2004, 167

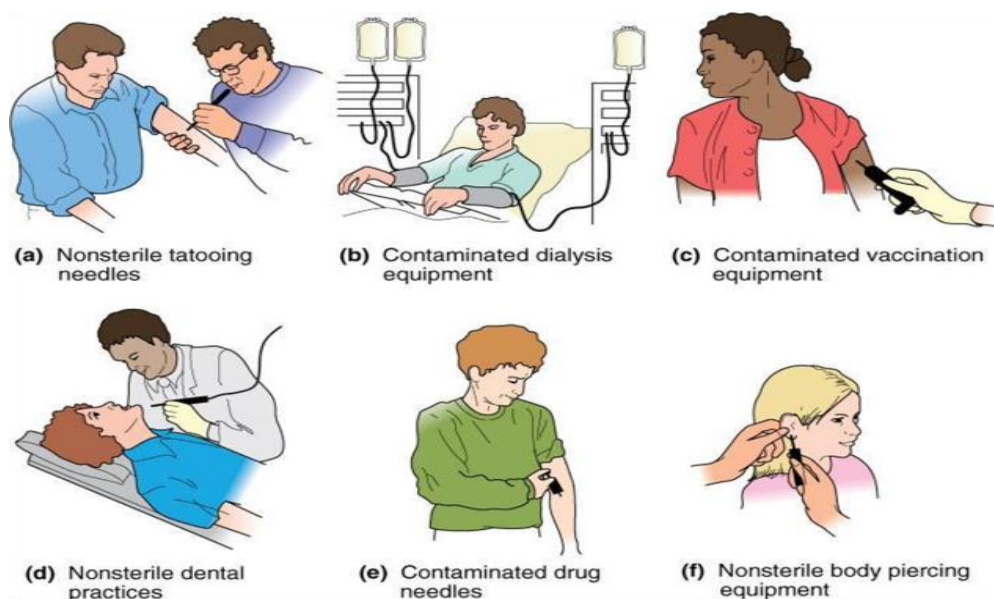
пред сè во единиците за хемодијализа и лабораториите, постои голема изложеност на ризик од ХБВ инфекција. Хепатитис Б е професионална болест кај медицинскиот персонал.

Трансмисија по сексуален пат и преку плунка

Инфекцијата со ХБВ е можна преку сперма и цервико-вагинален секрет. Поради тоа, таа спаѓа и во сексуално пренесливите болести. Плунката со придодадена крв овозможува трансмисија на ХБВ.

Трансмисија мајка - дете

ХБВ инфекцијата на новороденото многу го зголемува ризикот за развој на хронична инфекција. Оваа трансмисија се реализира кога мајката има акутен хепатитис во третиот триместар од бременоста или во неонаталниот период, додека на почетокот од бременоста таа е можна кај жени со хронична инфекција. Перинаталната инфекција се очекува приближно кај 90% од новородените, доколку кај мајката е присутен HbsAg.¹



Слика 3. Трансмисија на ХБВ
Figure 3. Transmission of Hepatitis-B virus

1.1.4. Патогенеза

Инфекцијата со хепатитис Б може да биде акутна и хронична, придружена со варијабилни црнодробни лезии: од тотална латенција и аниктерична цитолиза до тотална акутна црнодробна некроза, потоа преку цел спектар на хронични хепатити до црнодробна цироза, за понекогаш да заврши и како хепатоцелуларен карцином. Размножувањето на ХБВ во црнодробните клетки започнува по три дена откако вирусот ќе навлезе во крвта. Репликацијата се одвива во хепатоцитите. Хепатоцитите ја толерираат инфекцијата и обично тие не трпат оштетување од страна на вирусот. Симптомите на болеста може да не се појават дури и до 45 дена или подоцна, во зависност од инфективната доза и патот на пренесување. Интеграцијата на вирусниот геном во хромозомите на домаќинот за време на репликацијата е основа за латентноста на инфекцијата. Продукцијата и продорот на големи количества на HBsAg и комплетни вириони во крвта овозможуваат формирање на имуни комплекси. Имуните комплекси коишто се формираат од страна на HBsAg и нивните специфични антитела се одговорни за хиперсензитивните реакции што се презентираат како артритис, осип, васкулитис, црнодробни лезии и др.

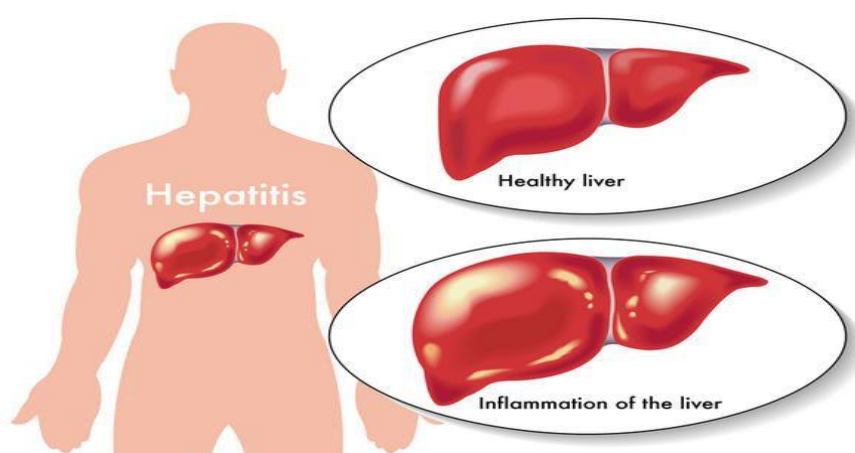
1.1.5. Клинички манифестации

Инкубацијата е долга и трае од 45 до 180 дена. Периодот секогаш варира од 40 дена до 6 месеци, но најчесто е 2-3 месеци. Следена е зависноста на ефектот од инфективната доза, така што пократок период на инкубација е поврзан со инфицирање со големи дози на вирусот.²

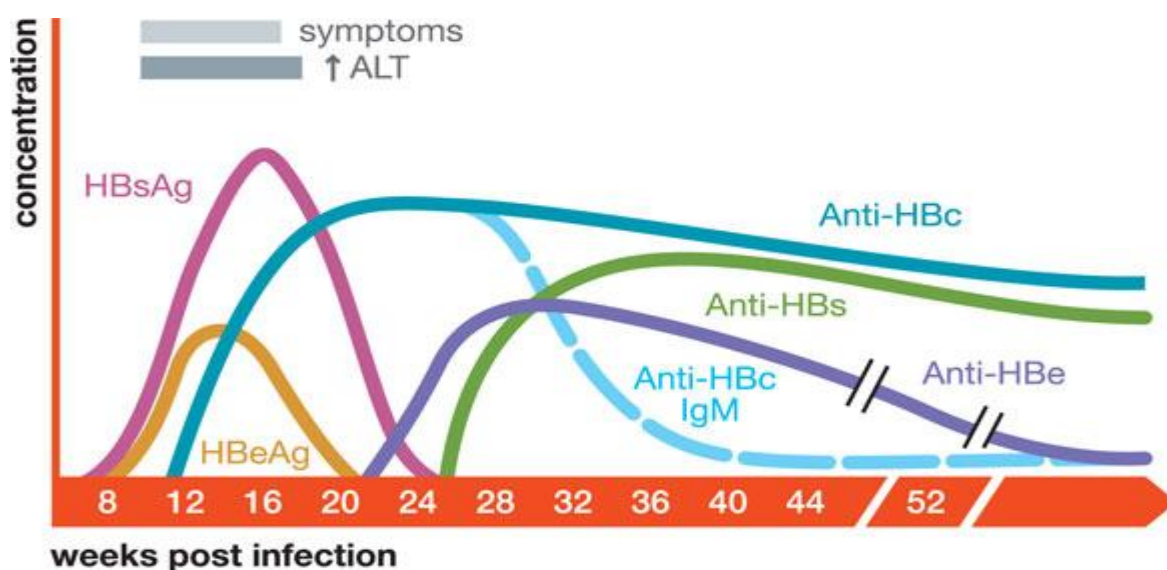
Хепатитис Б вирусот може да предизвика акутна и хронична црнодробна болест.

Акутна ХБВ болест и акутна ХБВ инфекција: Кај возрасни лица коишто имаат здрав имунолошки систем акутната ХБВ болест најчесто е лимитирана на неколку седмици. Повеќето пациенти имаат лесни неспецифични симптоми: замор, висока температура, болки во зглобовите, уртикарија, наузеја, стомачни болки и многу други симптоми. Исто така, кај голем дел од пациентите се среќаваат и темна урина, пожелтување на склерите и др. Болеста се развива во неколку форми:

- **Акутна иктерична и аниктерична форма**, кај оваа форма обично се појавува жолтица како кај хепатитис А по продромалниот стадиум и инкубациски период од 2 до 6 месеци. Акутната инфекција преминува во хронична во 10-20% од случаите.
- **Хроничната ХБВ инфекција** се дефинира со позитивност на крвта во времетраење од 6 месеци. Хроничната вирусна инфекција се карактеризира со јасно изразени симптоми на црнодробна инфламација кога се присутни изнемоштеност, замор и артралгија.⁴



Слика 4. Здрав црн дроб и црн дроб со хепатитис Б инфекција
Figure 4. Healthy liver and liver with hepatitis-B infection



Слика 5. Маркери кај ХБВ инфекција
Figure 5. Hepatitis-B markers

1.1.6. Лекување

За хепатитис Б како вирусна болест нема специфичен лек за лекување. Третманот при **акутниот вирусен хепатитис Б** е:

- хранење со добро балансирана храна;
- избегнување на алкохол;
- интравенска инфузија на течности;
- подобрување на работата на црниот дроб (левулоза);
- примена на витамини и лекови од групата на хепатопротектори.

Третманот на **хроничниот хепатитис Б** зависи од тоа дали вирусот е активен и дали има оштетување на црниот дроб. Современото лекување на хроничниот хепатитис Б бара нормализирање на хепаталните ензими и намалување на вирусната репликација за да се заштити црниот дроб од тешки компликации. Пациентите со хроничен хепатитис Б се лекуваат со интерферон-алфа и нуклеозид / нуклеотидни аналози.

Интерферон - алфа го активира имунолошкиот систем на организмот да се бори против инфицираните црнодробни клетки со ХБВ. Тој поседува и директно антивирусно дејство. Третманот со интерферон алфа не доведува до појава на вирусна резистенција, но неговата примена е ограничена со време до 12 месеци.

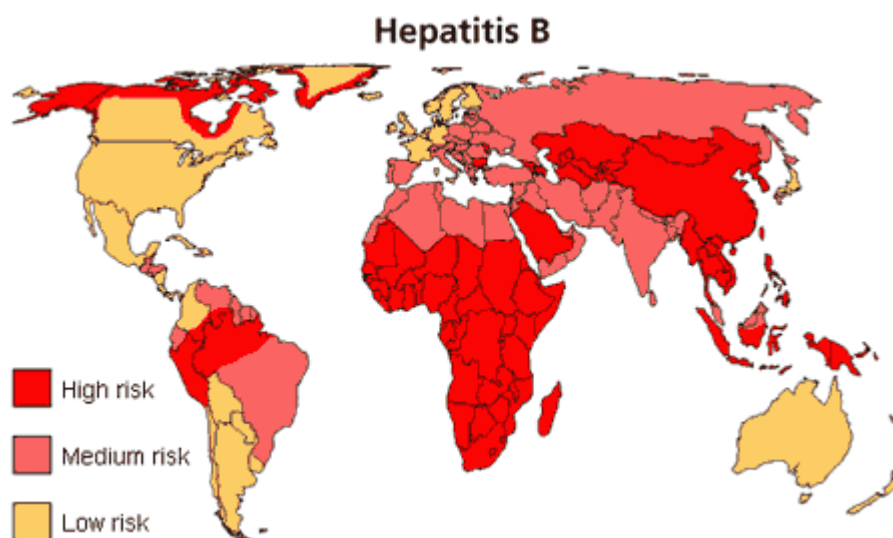
Нуклеозид/нуклеотидни аналози го блокираат размножувањето на хепатитис Б вирусот во клетките на црниот дроб и се ефикасни само при активна вирусна репликација. Третманот продолжува со години и често доведува до развој на резистенција.⁶

1.1.7. Епидемиологија

Во светот бројот на регистрирани лица со хепатитис Б е голем, се претпоставува дека изнесува околу 2 милијарди луѓе односно кај 1 од 3 луѓе. Бројот на хронично инфицирани луѓе изнесува 240 милиони. 10-30.000.000 ќе станат инфицирани секоја година. До еден милион луѓе секоја година умираат поради компликации настанати од хепатитис Б, како што е рак на црниот дроб.⁷

⁶ Management of Patient with Viral Hepatitis, Patrick Marcelin, September 2004, Paris, France

⁷ <http://www.hepb.org/>



Слика 6. Хепатитис Б во светот
Figure 6. Hepatitis-B world wide

Во Република Македонија бројот на регистрирани лица со хепатитис Б е околу 2.171, но се претпоставува дека оваа бројка е поголема.⁸

1.1.8. Заштита од ХБВ

Вирусот хепатитис Б е многу инфективен, но со почитувањето на потребните мерки се заштитуваме себеси, но и околината околу нас со:

- употреба на кондом при сексуални контакти;
- избегнување на тетоважи и пирсинг;
- да не се користат заеднички жилети, сечалки за нокти, четки за заби или обетки.⁹

Постои вакцина која создава имунитет и штити од евентуално заражување со вирусот на хепатитис Б. Во Република Македонија оваа вакцина е задолжителна за сите новороденчиња од 2004 година. Ваксината се дава во три дози. Првата доза е 12 часа по раѓањето, првата ревакцинација е по 1-2 месеци, втората ревакцинација се дава по 6 месеци. Ваксината се става

⁸ <http://www.nvohepta.mk/>

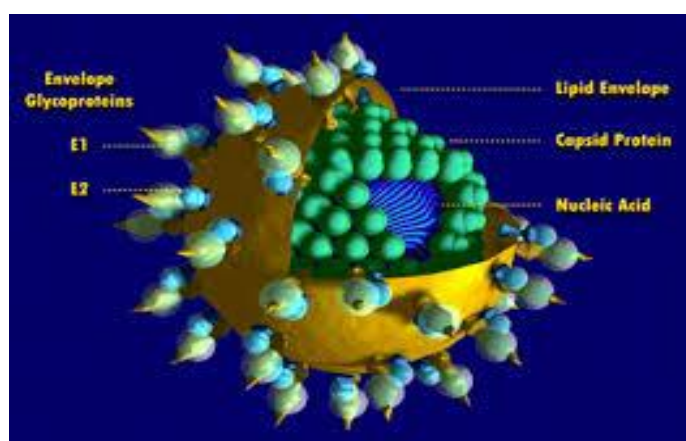
⁹ <http://www.genicalab.com/>

интрамускулно. Сите лица коишто ја примаат вакцината се заштитени од акутен хепатитис Б, хроничен хепатитис Б, цироза, како и нејзини компликации. Исто така, оваа вакцина може да ја примаат и возрасни лица кои имаат ризик од инфекција, пример хетеросексуалци со повеќе од еден партнер, мажи кои имаат секс со мажи, здравствени работници, пациенти на хемодијализа.

1.2. Хепатитис Ц вирус

1.2.1. Структура

Хепатитис Ц вирусот (ХЦВ, HCV) припаѓа на семејството *Flaviviridae*. Тој е РНК вирус составен од единечна верига на РНК. Обвивката е составена од околу 9.400 базни геноми енкодирани во три структурни протеини, нуклеокапсид, многубројни неструктурни протеини од типот с100 мембрански асоцирани протеини, хеликази, протеази и РНК полимераза. Структурните вирусни протеини се нуклеокапсидот и два гликопротеини: Е1 и Е2. Е2 протеинот ја иницира синтезата на неутралните антитела. Неструктурните вирусни протеини имаат регулаторна функција во процесот на репликација. ХЦВ се реплицира во хепатоцитите и веројатно во Т и Б лимфоцитите. Полуживотот на вирусот е 2,7 часа, а дневното производство во инфицираното тело има 10 трилиони, односно околу 1.012 вириони. Денеска се познати околу 6 генотипови на вирусот и 50 подвидови.¹⁰

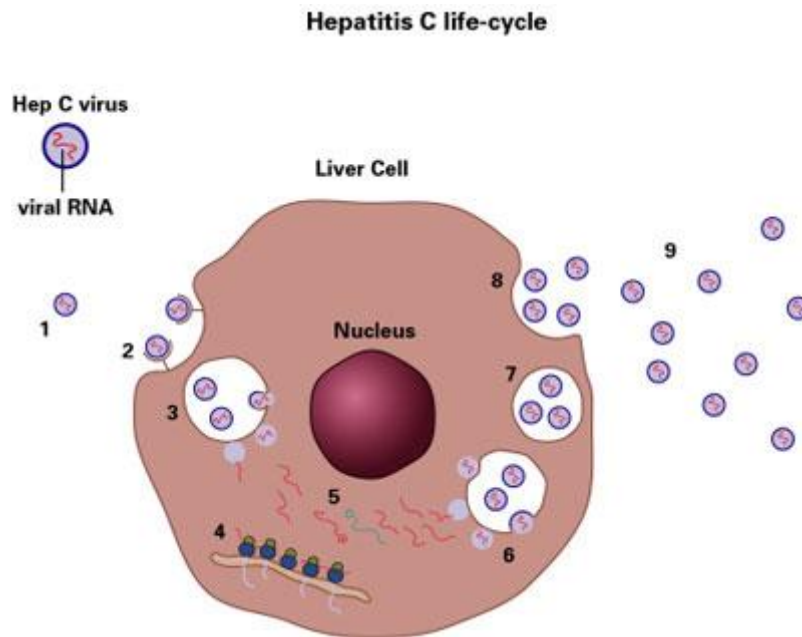


Слика 7. Структура на ХЦВ
Figure 7. Structure of Hepatitis-C virus

¹⁰ Hepatitis C virusna infekcija-virusoloski i patofiziološki aspekt, Dobrila Stankovic, Marica Otasevic, Gordana Tasic, Marina Dinic i Biljana Miljkovic-Selimovic, декември 2001, 44-45

1.2.2. Репликација

Процесот на репликација е следен со многу дилеми. Не се идентификувани вирусни специфични клеточни рецептори. Процесите на пенетрација и декапсидација на вирионот сè уште не се познати. Транслацијата на геномската iRNA е најверојатно независна. За транслацијата е одговорна секундарната структура на 5' крајот од секвенцата која е комплементарна на пиримидинската 18 с рибозомалната РНК.¹¹



Слика 8. Репликација на вирусот
Figure 8. Virus replication

1.2.3. Трансмисија

Начинот на пренесување на ХЦВ е различен. Познати фактори на ризик се:

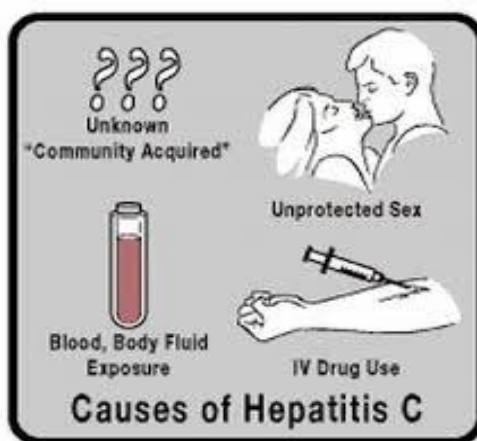
- примање трансфузија или крвни продукти до 1995 година;
- парентерална експозиција;
- употреба на дрога;
- нозокомијална изложеност.

Доколку не се следат мерките за универзална заштита, односно кога станува збор за низок социјално-економски стандард, преносот е различен. Фактори на пренесување се:

- перинатален пренос;
- тетоважи или пирсинг на телото;
- долгорочна хемодијализа;
- професионална изложеност (здравствени работници);
- шмркање кокаин;
- промискуитет.

Сè уште има многу случаи во кои факторите на ризик за веќе постоечка инфекција не може да се идентификуваат.

Според Центарот за контрола на болести во САД (CDC), најголемиот број на заболени од вирусот на хепатитис Ц е по употребата на инјектирање дрога.¹¹



Слика 9. Трансмисија на вирусот
Figure 9. Transmission of the virus

1.2.4. Патогенеза

Кај 70% од болните со акутна ХЦВ инфекција таа еволуира во перзистентна инфекција со клиничко и патохистолошко хронично заболување на црн дроб што има прогресивен тек, од хроничен неагресивен, преку хроничен агресивен хепатит до цироза на црниот дроб и евентуално хепатоцелуларен карцином. Патогенетските механизми коишто доведуваат до

¹¹ Vodic za hepatitis B i C, Mehmed Gribajčević Zora Vukobrat-Bijedić Nadir Lačević

оштетување на хепатоцитите кај болен со ХЦВ инфекција не се во потполност согледани.¹²

1.2.5. Клинички манифестации

1.2.5.1. Акутен хепатитис Ц

Инкубацијата трае од 3 до 12 недели (просечно 8 недели). Најпрвин се развива акутна ХЦВ инфекција, која најчесто останува инапарентна. Само околу 20% се појавува симптоматски и тогаш се развива клиничка слика која не може да се разликува од другите акутни вирусни хепатити. Болните се жалат на мачнина, замор, гадење, повраќање, болки под десниот ребрен лак, а иктерус се јавува кај 20% од болните. Некои болни спонтано закрепнуваат по инфекцијата, а оние со благ тек на болеста не се обраќаат на лекар. Фулминантен облик на акутен хепатитис Ц е ретка појава. Акутниот хепатитис обично трае околу 6-12 недели и може да се смета за бениген. Смртноста од акутен хепатитис Ц се проценува на помалку од 1%.

1.2.5.2. Хроничен вирусен хепатитис Ц

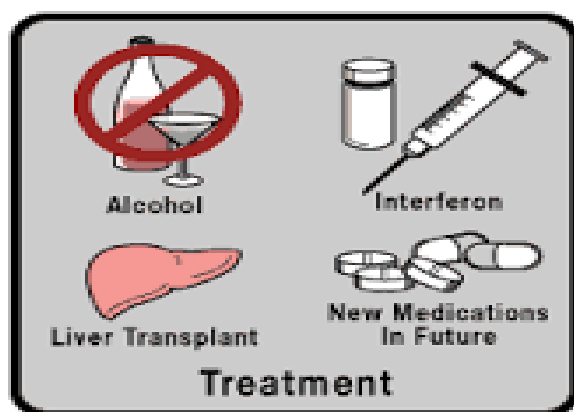
Кај 80% од болните со акутен хепатитис Ц се развива хронична инфекција. Траењето на акутен вирусен хепатитис Ц повеќе од 6 месеци укажува на хроничен хепатитис Ц. Таквите болни вообичаено немаат никакви тегоби или се многу благи. Најчест симптом на болеста е необјаснет умор, без оглед на дневен одмор. Уморот може да трае неколку недели или месеци, може спонтано да престане или да се појави повторно, што е најчесто поврзано со појава на патолошки вредности на АЛТ во серумот. И кај асимптоматски болни со хроничен хепатитис Ц вредностите на ALT може да бидат патолошки, слични со оние кај болните со наведените симптоми. Истражувањето во последните години покажува јасна поврзаност меѓу ХЦВ и цироза на црниот дроб, односно хепатоцелуларен карцином.¹³

¹² Regina, et al., 1995; Fields and Knippe, 1996

¹³ Prim. dr. M. Ferhatović, prim. dr. N. Bajramović, dr. R. Gojak

1.2.6. Лекување

За лекување на вирусен хепатитис Ц се користи алфа интерферон во комбинација со рибавирин. Се работи за ретард форма на интерферонот која овозможува администрирање на лекот еднаш неделно, а рибавиринот се употребува 6-12 месеци.¹⁴



Слика 10. Лекување на вирусот хепатитис Ц
Figure 10. Treatment of hepatitis C

1.2.7. Епидемиологија

Инфекцијата со хепатитис Ц претставува значаен здравствен проблем. Според Светската здравствена организација (СЗО) заразени се меѓу 170 и 200 милиони лица, што е приближно 3% од вкупната популација. Се претпоставува дека 1% се општа популација, 3% здравствени работници и преку 50% интравенски наркозависници и преку 70% лица на дијализа.¹⁵

¹⁴ Dijagnoza i terapija hronicne hepatits C virusne (HCV) infekcije, Beograd, juni 2003, prof dr. Neda Švirtlih, doc. dr. Miodrag Krstić

¹⁵ Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. Hepatology 2013; 57:1333.

2. ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Главната цел на специјалистичкиот труд е прикажување на бројот на лица со вирусен хепатитис Б и вирусен хепатитис Ц во Штип во периодот од 2010 до 2015 година.

Останати цели се прикажување на:

- Можностите за современа микробиолошка дијагностика на хепатитис Б и хепатитис Ц вирусни инфекции;
- Тестовите кои се изведуваат во микробиолошката лабораторија во Центарот за јавно здравје во Штип;
- Вкупниот број на изведени тестови, бројот на позитивни и негативни лица со хепатитис Б и хепатитис Ц;
- Правилно изведување на тестовите, користење на брзи тестови и користење на потврдни тестови;
- Прикажување на бројот на позитивни лица со хепатитис Б и хепатитис Ц кај најризичните групи во Центарот за наркозависници, Центарот за дијализа и Казнено-поправниот дом во Штип.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА

Користени се и анализирани се податоците од Центарот за јавно здравје во Штип, Центарот за наркозависници во Штип, Центарот за дијализа во Штип, Казнено-поправниот дом во Штип, научни трудови, публикации, податоци од WHO, CDC, ECDC.

- Испитувањето вклучува 5.149 испитаници за хепатитис Б од Центарот за јавно здравје во Штип кои се поделени според возраст и пол во периодот од 2010 до 2015 година и 3.252 испитаници за хепатитис Ц.
- 35 испитаници од Центарот за наркозависници во Штип поделени според возраст и пол.
- 350 испитаници од Казнено-поправен дом во Штип.
- 33 испитаници од Центарот за дијализа во Штип.

Анализираните испитаници се поделени според возраст и пол, тестирањата се спроведени со анализа со брзи тестови, а како потврден тест е користена ELFA техника на апаратот VIDAS.

4. ТЕСТОВИ ЗА ДЕТЕКЦИЈА НА ХЕПАТИТИС Б И ХЕПАТИТИС Ц

Лабораториската детекција на ХБВ и ХЦВ во примерок е можна со:

- Серолошки испитувања со ELISA (Директна детекција на антигени или и индиректна детекција на антитела);
- Имунохроматографски (брзи тестови);
- Молекуларни методи:
 - Квалитативна ХБВ или ХЦВ детекција: PCR детекција, примена на АСО (алел-специфична) хибридизација, генотипизација со примена на ДНК/РНК секвенционирање со помош на ДНК/РНК анализатор.
 - Квантитативна детекција: одредување на вирусно оптоварување (viral load) со примена на RT (Real time) PCR.

4.1. Тестови за детекција на хепатитис Б

Рутинската серолошка дијагностика се базира главно на 3 пара антигени и антитела:

- Хепатитис Б површински антиген - (HBsAg) и кореспондира со негово антитело (anti-HBs);
- Хепатитис Б е-антиген (HBeAg) и кореспондира со негово антитело (anti-HBe);
- Хепатитис Б нуклеарниот антиген (HBcAg) и неговото антитело (anti-HBc).

За истражувањето на овие 3 антигени и 3 антитела најшироко е користен имуноензимскиот метод (ELISA и ELFA).

Постојат уште два маркери за ХБВ:

- ДНК полимераза;
- Хепатитис Б вирусна ДНК (HBV DNA) - вирусна репликација.

Мерењето на ХБВ ДНК со помош на молекуларно-хибридизационен метод е воведена во 1980 година. Во денешни денови најчесто се мери со помош на PCR техника (Полимераза верижна реакција).¹⁶

Според клиничките показатели инфекцијата со ХБВ се разликува од останатите типови на вирусни хепатити. За утврдување на дијагнозата се користат различни дијагностички методи:

Неспецифични методи

Го мерат показателот карактеристичен за појавата на хепаталното нарушување, без да се утврди причината за болеста:

- Се мери нивото на билирубин во урината, високите нивоа на билирубин во крвта се индикација за хепатит, без да се утврди причината за болеста;
- Се мери нивото на хепаталните ензими во крвта, зголемените вредности се показател дека има разорување на црнодробните клетки и нарушување на билијарниот тракт;
- Аланин-аминотрансфераза ензим (АЛТ);
- Аспартат-аминотрансфераза ензим (АСАТ);
- Алкална фосфатаза (аф);
- Гама глутамил-транспептидаза (ГГТ).

Специфични методи - со специфичните методи се одредува причинителот на воспалението на црниот дроб и фазата на болеста. Овие методи се поделени на индиректни и директни:

Индиректни методи - одредување на специфични антитела против ХБВ во крвта (серолошки методи). Имунолошкиот систем произведува специфични

¹⁶ <http://www.hepactive.org/>

антитела за заштита против ХБВ кои циркулираат во периферната крв и се користат како индиректен доказ за присуство на вирусот.

- Јадреното антитело anti-HBc или HbcAb ни претставува првото антитело кое се појавува во крвта (обично првата недела по заражувањето со хепатит) HbcAb се открива кај секој којшто бил некогаш заразен со вирусот.
- Анти „е“ антитело (anti-HBe или HBeAb) е антитело против „е“ антигенот од внатрешноста на ХБВ. HBeAb се открива кога телото се бори со хепатитис Б вирусната инфекција и е показател за ниски нивоа на вирусот.
- Површинско антитело (anti-HBsAg или HBsAb) – претставува антитело против површинскиот антиген на ХБВ. При произведување на доволни количини на HBsAb организмот може сам да се избори со ХБВ инфекција.

Антитела се појавуваат некое време по инфицирањето со вирусот, што може да биде причина за добивање на лажно негативни резултати во почетниот стадиум од инкубацијата. Од друга страна, присуството на антитела се забележува дури и по целосно излекување, и затоа нивното присуство не е задолжителна индикација за активна инфекција. Затоа е потребно користење на директни специфични методи за докажување на вирусните честички во организмот.

Директни методи - се утврдува присуството на вирусот преку откривање на молекули специфични за вирусните честички:

- Докажување на хепатитис Б антигени - директен маркер за хепатитис Б инфекција кој се појавува пред клиничките симптоми.
- Површински антиген (HBsAg) - антиген од обвивката на вирусот претставува првиот антиген кој се појавува во организмот со инфицирање со ХБВ вирусот (околу четири недели по инфицирањето). Кога HBsAg ќе се задржи повеќе од 6 месеци во организмот инфекцијата се смета за хронична.

- „Е" антиген (HBeAg) - антиген од внатрешноста на вирусот, претставува вториот антиген кој се појавува при активно размножување на ХБВ во клетките на црниот дроб.
- Јадрен антиген (HBsAg) – овој антиген не се открива при тест на крвта, се открива само при биопсија на ткиво од црниот дроб.

Детектирањето на генетскиот материјал (ДНК) на ХБВ во крв претставува директен маркер за присуство на вирусот од моментот на контакт со вирусот до моментот на расчистување на организмот од вирусот кој се карактеризира со следниве предности:

- Најточен дијагностички метод кој има максимална специфичност и сензитивност;
- Единствениот метод кој се применува од 5 до 7 дена по вирусната инфекција, односно неколку недели пред да се појават првичните симптоми на болеста. Ова е од особено значење за ограничување на ширењето на вирусот и лекување во ран стадиум што го штити организмот од појава на компликации и е гаранција за низок степен на оштетување на црниот дроб;
- Најбрзиот и прецизен метод кој опфаќа луѓе кои работат во ризична средина или комуницирале со заразено лице;
- Следење на ефектите од терапија и времето што е потребно за прочистување на организмот од вирусот;
- Многу точно се одредува присуството на размножување на вирус во крвта на пациентот (активна вирусна инфекција), што е важен фактор за успехот на третманот и неговото времетраење;
- Истражувањето се врши со методот на Полимераза верижна реакција (PCR). Овој тест е скап и се прави при тешки случаи, како и за следење на ефектите од терапијата.

Индикатори при акутен хепатитис:

- HBsAg - се појавува во крвта околу четири недели по инфицирањето;
- Anti-HBc;
- Присуство на вирусна ДНК.

Индикатори при хроничен хепатитис:

- HBsAg - присутен во крвта повеќе од шест месеци по заразувањето;
- HBeAg - обично е придружена со влошување на симптомите на хроничен хепатитис Б;
- Anti-Hbe;
- Anti-HBc;
- Присуство на вирусна ДНК.

Индикатори за излекувана или вакцинирана особа против хепатитис Б

- Anti-HBs - во крвта се откриваат само антитела кои се насочени против HbsAg;
- Сите други лабораториски испитувања се негативни;¹⁷
- ХБВ ДНК се појавува 6 недели по почетокот на инфекцијата и е маркер како за акутна, така и за хронична инфекција.

Во многу ретки случаи при акутен вирусен хепатитис Б, HBsAg може да не се открие поради многу ниски нивоа кои се под прагот на чувствителност на тестот. Иако овој маркер се појавува уште во почетокот на акутната инфекција, тој се открива до моментот на појавување на антитело anti-HBs. Односно, кога ќе исчезне едниот маркер би требало да се појави другиот.

Но сепак постои прозорец од време (или т.н. window period), при што HBsAg исчезнува и сè уште не се појавил anti-HBs. Општо земено, овој прозорец од време е многу мал, па дури и во повеќето случаи целосно недостасува. Иако антителата почнуваат да се произведуваат уште во почетната фаза на хепатитис, обично тие се премалку за да бидат докажани во текот на првите две фази. По завршувањето на фазата на жолтица веќе се забележува и исчезнувањето на антигените и појавата на антитела, што е и показател за тоа дека организмот успеал да се избори со вирусот. Прозорецот на време, при што е можно во серумот да не се откриваат ниту антигени ниту

¹⁷ <http://genicalab.com/>

антитела, т.е. HBsAg и anti-HBs да се негативни, може да биде и со времетраење од 45 дена кај хепатитис Б. Во фазата на закрепнување, HBsAg е негативен, а anti-HBs станува позитивен и тие се индикатори освен за губење на вирусот и за изграден имунитет против него, кој останува доживотно.

Другиот маркер кој се појавува за време на инфекцијата е HBeAg (маркер за инфекција).

За време на инфекцијата IgM anti-HBc се појавуваат за кратко време (околу 6 месеци и многу ретко до 12 месеци) по започнувањето на акутната ХБВ инфекција. Нивоата на IgG anti-HBc се зголемуваат доста бавно и конечно IgG anti-HBc заменува IgM anti-HBc.

HBeAg е погоден маркер за висока вирусна репликација. Тој се открива за време на раната акутна инфекција со хепатитис Б – се совпаѓа или се појавува малку по појавата на HbsAg и во повеќето случаи исчезнува во рок од неколку недели по акутната инфекција. Задржувањето на HBeAg во серумот за повеќе од 3-4 месеци предвидува долготрајна хронична инфекција. Кај пациенти со хронична инфекција HBeAg се открива од месеци до години и е сигнал за активната репликативна фаза на хроничен хепатитис Б инфекција. HBeAg исчезнува просечно кај 10% (од 9-19%) за една година кај пациенти со хроничен хепатитис Б. Тестот за HBeAg не е задолжителен за акутниот хепатитис Б, но е многу важен за хроничниот.

Хроничниот ХБВ хепатитис може да се подели на 2 основни типа:

- HBeAg позитивен и
- HBeAg негативен тип.

Во раните фази на хроничната инфекција се открива HbsAg и HBeAg - оваа фаза се карактеризира со висока репликација и висока инфективност.

Повеќето од пациентите завршуваат со исчезнување на HBeAg и појава на anti-Hbe, кое се совпаѓа со продолжено намалување на нивоата на вирусната репликација, има пад на нивото на хепаталните ензими до нормални вредности и пад на нивото на ХБВ ДНК под 10^3 - 10^4 copies / mL и тие стануваат

невидливи за стандардните молекуларни тестови. Овие пациенти поминуваат во фазата на неактивните носители.

Некои пациенти, кои се HBeAg-негативни и anti-HBe-позитивни можат да добијат реактивирање на хепатитисот со високи нивоа на ХБВ ДНК (> 105 copies / ml).¹⁸

Табела 1. Интерпретација на серолошки тестови за хепатитис Б
Table 1. Interpretation of the serological tests of hepatitis-B infection

ТЕСТ	РЕЗУЛТАТ	ЧИТАЊЕ
HbsAg	Негативен	Пациентот е подложен на инфекција со хепатитис Б пожелно е да се вакцинира
Anti-HBc	Негативен	
Anti-HBs	Негативен	
HbsAg	Негативен	Пациентот прележал хепатитис Б и природно е отпорен на него
Anti-HBc	Позитивен	
Anti-HBs	Позитивен	
HbsAg	Негативен	
Anti-HBc	Негативен	
Anti-HBs	Позитивен	
		Отпорен на хепатитис Б бидејќи се вакцинирал
HbsAg	Позитивен	Пациент со моментален акутен хепатитис Б инфекција
Anti-HBc	Позитивен	
Anti-HBc IgM	Позитивен	
Anti-HBs	Негативен	
HbsAg	Позитивен	Пациент со хроничен хепатитис Б инфекција
AntiHBc	Позитивен	
AntiHBc-IgG	Позитивен	
Anti-HBs	Негативен	

¹⁸ World Health Organization. Hepatitis B Immunization:2001

4.2. ТЕСТОВИ ЗА ДОКАЖУВАЊЕ НА ХЕПАТИТИС Ц

Постојат неколку различни тестови за дијагностицирање на хепатитис Ц:

- Тестови за ХЦВ антитела (индиректни);
- Тестови за ХЦВ вирусот или ХЦВ РНК тест (директни);
- Тест за ХЦВ генотип;
- Биопсија на црниот дроб.

Вирусолошката дијагноза на ХЦВ инфекцијата се заснова на употребата на две категории на тестови:

Индиректни тестови. За серолошка дијагноза на антителата на ХЦВ (anti-ХЦВ) се користат различни методи (EIA, CIA, најчесто ELISA), како и потврдни тестови кои откриваат антитела на одделни антигени на вирусот (тестот на имуноблот најчесто RIBA). Вкупните ХЦВ антитела се користат како почетни тестови за откривање на инфекцијата кои се појавуваат од 4-10 недела од заразата.

Комерцијалните тестови од трета и од четврта генерација ELISA anti-ХЦВ се високоспецифични и осетливи. Меѓутоа, сè уште се недоволни за дијагноза за ХЦВ кај лица кои се имunosупримирани и имаат низок титар на антитела или автоимуна болест. Исто така, присуството на вкупните, како и специфичните антитела не разликуваат активна од прележана инфекција. Поради ова, потврдните тестови се препорачуваат кај доброволни дарители на крв и други лица кои немаат познат ризик за инфекција. Кај лицата со болести на црниот дроб се применуваат тестови за одредување на ХЦВ РНК.

Директни тестови. Овие тестови ги откриваат, ги мерат и карактеризираат компонентите на ХЦВ честичките: ХЦВ РНК и антиген. Количината на ХЦВ РНК се изразува во интернационални единици во милилитри (IU/ml), стандардизиран од страна на Шведската здравствена организација. Методите за откривање на ХЦВ РНК најчесто се RT-PCR или ТМА. Тестовите можат да се применат во серуми и други течности, како и во ткивото на црниот дроб. Тестовите за ХЦВ РНК инфекцијата се откриваат за 1-2 недели од заразувањето со инфекцијата. Позитивниот резултат на ХЦВ РНК

потврдува присуство на вирусна репликација, активна инфекција, додека титарот на ХЦВ РНК е еднаков со вирусните честички.

Тест за генотип

Има неколку вида/типа на хепатитис Ц, кои се наречени генотипови. Овие генотипови се многу блиски, но имаат доста генетски разлики за да бидат класифицирани во 6 главни генотипови: 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Дополнително, генотипот може да се класифицира во поттипови, како генотип 1а, 1б итн. Генотип 1 е најчесто детектиран генотип (70-75%) во САД, потоа следат генотиповите 2 и 3 (25-30%). Информацијата за генотипот е многу важна, кога се започнува со лечењето.¹⁹

Биопсија на црн дроб

Биопсијата на црниот дроб се прави за да се утврди моменталната состојба на црниот дроб, вклучително и моменталната воспалителна состојба. Најчест вид на биопсија е преку кожата. Може да се направи и ултразвук пред процедурата за да се одреди областа каде што иглата треба да биде ставена. Медицинскиот работник приготвува локална анестезија за да се намали болката. Тенко парче се вовлекува со помош на иглата. Процедурата се изведува за неколку секунди. Приближно 30-50% од пациентите чувствуваат болка. Биопсијата обично се прави на секои 5-7 години.

Одредување на бројот на вируси во крвта

Одредувањето на бројот на вируси во крвта (квантификација ХЦВ РНК) се изведува на неколку начини: квантитативна PCR и branched DNA (b DNA) тест. Овие тестови не се стандардизирани и изведувани во различни лаборатории може да дадат различни резултати на истиот примерок. Сепак, кога ќе се изведат тестовите прикажуваат добар увид за хепатитис Ц. Голем број пациенти со хроничен хепатитис Ц имаат меѓу 100 000 и 10 000 000 копии

¹⁹ Prince AM, Brotman B, Lee D-H, et al. Protection against chronic hepatitis C virus infection after rechallenge with homologous, but not heterologous, genotypes in a chimpanzee model. J Infect Dis 2005;192:1701–9

на ml. Бројот на вирусите не е поврзан со тежината на хепатитис Ц и лошата прогноза.

Биохемиски показатели на ХЦВ инфекција

Се однесува на промената на црнодробните ензими АЛТ и АСТ. Црнодробните ензими се покачуваат отприлика за 6-12 седмици од инфекцијата. Кај хроничен хепатитис Ц вредностите се покачуваат од 0 до 20 пати во однос на горната граница на нормалните вредности. Вредностите на АЛТ обично се поголеми од вредностите на АСТ, но ова може да биде обратно кај болните со цироза. Нивото на црнодробните ензими може да се менува кај акутната инфекција; нивото на АЛТ може да се нормализира кај голем број на болни, што не е знак за оздравување. Другите ензими, алкална фосфатаза (AP) и гама-глутамил транспептдаза (GGT) обично се нормални. Зголемените вредности може да бидат знак за цироза. Појавата на ревматоидниот фактор (RF) и нискиот број на тромбоцити и леукоцити во крвта чести се кај пациентите со тешка фиброза или цироза, и тоа е знак за напредок на болеста. Ензимите лактат дехидрогенеза (LDH) и креатин киназа (CK) обично се нормални.²⁰

4.3. Техника за откривање на HbsAg со VIDAS апарат

Техниката за откривање на HbsAg е ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) или ензимски флуоресцентна имуноаналитичка техника која се изведува со VIDAS автоматски систем. Анализата може да биде изведувана во 2 периода: HBL долг период (90 минути) или HBS краток период (60 минути).

Цврстата приклучна фаза (Th Solid phase receptacle SPR) служи како цврста фаза и како пипетна направа за анализата. Реагенсите за анализата се подготвуваат во запечатени реагенсни ленти.

²⁰ Praćenje liječenih i neliječenih bolesnika s virusnim hepatitisom - V. Čolić-Cvrlje, R. Ostojić, Acta Med Croatica, 67 (2013) 345-349

Сите чекори во анализата се автоматизирани од инструментот. Реакциската постапка се повторува неколку пати во и надвор од SPR.

По добро перење, антигенот присутен во примерокот се врзува симултано со моноклонални антитела и го обојува внатрешниот простор на SPR. Неврзаните антитела исчезнуваат. Понатаму неврзаните компоненти од примерокот се мијат. Антигенот врзан за цврста фаза и антитело се во контакт со стрептавидин конјугиран со алкална фосфатаза, која ќе се поврзе со компонентите. За време на финалниот чекор за откривање на подлогата супстратот - метил фосфат е внатре и надвор од SPR. Конјугираниот ензим ја катализира хидролизата на овој супстрат во флуоресцентни производ на флуоресценција на која се мери во 450 nm. Интензитетот на флуоресценција е пропорционален на концентрацијата на антигени присутни во примерокот.



Слика 11. VIDAS апарат
Figure 11. VIDAS apparatus

SPR

Внатрешноста на SPR е обложена во текот на производството со моноклонални антитела против anti-HBs.

Потрошни материјали кои се потребни

- Пипета со еднократен врв од 1 ml и 150 µl;
- Ракавици без пудра.

Предупредувања и мерки

Китот содржи производ од човечко потекло. Ниедна позната анализа не може целосно да го гарантира отсуството на трансмисивни патогени агенси. Затоа е препорачливо овие производи да бидат третирани како потенцијално инфективни и да се ракува со посебна внимателност и мерки на безбедност.

Можна е контаминација на примерок со примерок преку контакт со ракавици: кога е присутна голема концентрација на HBsAg. Се препорачува да се прочитаат упатствата пред употреба. Исто така, се препорачува да се чува дел од серумот ако е потребно повторно тестирање на HBs антиген.

Останати препораки

Да не се употребува SPRs ако торбичката е прободена.

Да не се употребува видливо оштетена SPRs (оштетена фолија или пластика).

Да не се употребуваат реагенси со минат рок на употреба.

Да не се мешаат реагенси од различни делови.

Да се употребуваат ракавици со пудра, бидејќи пудрата предизвикува давање на лажни резултати за одредени ензимски имунотестови.

Комплетот реагенси содржи натриумска киселина која во допир со жива или бакар може да реагира и да формира експлозивни метални азиди. Ако која било течност што содржи натриумска киселина е истурена во водоводниот систем треба да се истурат поголеми количини вода за да се оневозможи градењето на натриумската киселина.

Ако се истури од течноста таа треба да биде темелно избришана по третманот со течен детергент или со средство кое содржи минимум 0.5% натриум хипохлорит.

Инструментот треба да биде секојдневно чистен и деконтаминиран.

Услови за чување

Да се чува на температура од 2 до 8 степени VIDAS HBsAg Ultra.

Реагенсите да не се замрзнуваат, со исклучок на S1 стандардот по реконституција.

Сите неискористени реагенси да се чуваат на температура од 2 до 8 Целзиусови степени, со исклучок на S1 стандардот кој мора да биде чуван во замрзната состојба по реконституција.

По отворање на китот мора да се провери дали SPR торбичката е коректно поставена и неоштетена. Ако е оштетена да не се користи.

По употребата, внимателно се враќа торбичката во фрижидер на температура од 2 до 8 степени.

Ако се чуваат според препорачаните услови, сите компоненти ќе останат стабилни до истекот на рокот на употреба.

Примероци

Видови на примерок

Се употребува серум (празно цевче, цевче со гел за сепарирање, празно цевче со моноистра) или плазма собрана во епрувета со литиум хепарин. Серумот и плазмата треба да бидат чувани одделно од палетата. Примероците кои содржат нечистотии мора да поминат претходно на центрифугирање.

Кај досегашните резултати не е пронајдено влијание од:

Иктерични примероци (билирубин концентрат до 500 наномол/л), хемолизирани примероци (хемоглобин концентрат до 270 наномол/л од мономер) и липемички примероци (до 30 mg/ml).

Стабилност на примерокот

Примероците можат да бидат чувани до 5 дена во затворени цевчиња на температура од 2 до 8 Целзиусови степени. Ако е потребно чување повеќе од 5 дена, серумот или плазмата треба да се замрзнат и да се чуваат на температури од -25 до -6 Целзиусови степени. Студија на примероци кои биле чувани 2 месеци покажала дека нема влијание периодот доколку примероците се замрзнати.

Инструкции за употреба

Пред секоја употреба на реагенси е потребно да се внесат податоци во напредниот систем за внес на податоци. Доколку ова не е направено пред тестирањето, инструментот нема да биде во можност да ги отпечати податоците.

Калибрација

Калибрацијата на апаратот мора да се прави по внесувањето на податоците во системот и приемот на нови реагенси. Калибрацијата се прави на секои 14 дена. Оваа операција овозможува инструмент-специфични кривини за калибрација и ги компензира малите варијации во анализата со сигнализирање преку рокот на траење на пакетот.

Стандардот, идентификуван како S1, мора да биде тестиран во дупликат. Стандардната вредност мора да биде во сетот RFV - Релативна флуоресцентна вредност. Ако ова не е исполнето ќе мора да се рекалибрира.

Процедура

1. Од фрижидерот се земаат само потребните реагенси и се оставаат до 30 минути на собна температура.
2. Се употребува една „HBS“ лента и една „HBS“ SPR за секој примерок кој ќе биде тестиран. Складираните вреќички внимателно се затвораат по вадење на потребните SPRs.

3. Тестот се идентификува од HBS кодот на инструментот или од HBL кодот за долгиот протокол. Стандардот мора да биде идентификуван со S1 и тестиран во дупликат. Ако се тестира позитивна контрола, треба да се идентификува со C1. Ако се тестира негативна контрола треба да се идентификува со C2.
4. Стандардот, контролата и примероците се мешаат со вортекс / миксер.
5. За овој тест калибраторот, контролата и порцијата за тест примероците е 150 нанолитри.
6. Се внесуваат HBS, SPRs и HBS лентите во инструментот. Се проверува дали бојата на лентите соодветствува со кодот на анализата.
7. Сите чекори од анализата се автоматизирани од страна на инструментот.
8. Се затвораат ампулите и се враќаат на потребната температура по пипетирањето.
9. Анализата завршува во рок од 60 до 90 минути во зависност од селектираниот протокол. Кога е испитувањето завршено, SPRs лентите треба да се извадат од инструментот.
10. Се ставаат лентите и SPRs во правилен примач.

Резултати и интерпретација

Кога ќе заврши анализата, резултатите се анализираат автоматски од компјутерот. Флуоресценцијата се мери двапати во лентите од реагенсите каде што се читаат киветите за секој примерок што е тестиран. Првото читање е во позадина од супстратската кивета пред внес на супстратот во SPR. Второто читање е по вметнувањето на супстратот со ензимите во внатрешноста на SPR. Релативната флуоресцентна вредност се вкалкуира со одвојување на заднинското читање од финалниот резултат. Оваа калкулација се покажува на листот со резултатите.

Исто така, на листот со резултатите се прикажани и вредноста на тестот и интерпретацијата. Ако некој пациент има позитивен резултат, а претходно нема историја, анализата мора да се повтори и да биде потврдена со неутрализирачки тест или со други тестови.

Позитивен резултат од примерокот треба да биде потврден со истиот протокол за анализа, како што е употребен во тестирањето на примерокот.

Пред повторното тестирање примероците се центрифугираат повторно за да се елиминираат можни попречувања предизвикани од фибрински фрагменти или елементи од клетки.

При интерпретацијата на резултатите од тестот треба да се земат предвид и историјата на пациентот и резултатите од други тестови.

VIDAS HBsAg Ultra е калибриран со панелот на француското трансфузиолошко здружение.

Контрола на квалитет

Една позитивна и една негативна контрола се вклучени во секој VIDAS HBsAg Ultra. Овие контроли мора да се направат веднаш по отворањето на нов пакет за да се осигура дека реагенсите не се променети. Исто така, секоја калибрација мора да биде проверена користејќи ги овие контроли. Инструментот ќе биде во можност да ги провери само доколку се идентификувани C1 и C2.

Резултатите не можат да бидат валидни доколку контролните вредности отстапуваат од очекуваната вредност.

Ограничувања на методот

Резултатот може да се прогласи за позитивен само со земање предвид на историјата на пациентот и резултатите од другите маркери за хепатитис Б.

Негативен HBsAg резултат не ја исклучува можноста од инфекција од хепатитис Б вирусот. Концентрацијата на серумот со HBsAg може да биде под аналитичката сензитивност од реагенсите. Исто така, не може да се исклучи и можноста за присутност на модифицираниот HBs антиген кој во овој случај може да биде погрешно препознаен од антителата во реагенсите.

Во ретки случаи можно е детектирање на антиген HBs и anti-HBs антитела.

Анализата е направена за серум и плазма и може да се користи за други биолошки течности како плунка, CSF или мокрача.

Анализата не треба да користи примероци кои се постсмртни.²¹

4.4. Техника за откривање на HbsAg и anti-HCV со брзи тестови

(Rapid tests)

Принцип: имунохроматографски.

Основа на тестот

HBsAg и anti-HCV тестовите се составени од стакленца за примерок кои вклучуваат предметно стакло врз кое се капнува крвната плазма/серум. Предметното стакло се држи на пропустлива мембрана. Мембраната содржи три области со антитела. Првата од тие области е мобилна или подвижна, а другите се стабилни. Мобилната област вклучува моноклонални антитела и златни колоидални честички кои се сензитивни на боја. Стабилната област која ја формира линијата на тестот е, всушност, таа која ја формира стабилната област на мембраната. Третата област која ја формира контролната линија вклучува анти/гљувчешки имуноглобулини. Серумот или примерокот од серумот/плазмата започнува да се мрда на мембраната и доколку примерокот вклучува доволен број на HBs антигени или anti-HCV во радиус на сензитивноста на направата, anti-HBsAg формира комплекс со колоиден златен коњугат и се движи кон областа на тестот која е покажана од буквата Т. Потоа, комплексот кој е создаден во оваа област и понатаму формира линија кон буквата Т. Бидејќи линијата е поврзана со антигените на HBsAg во примерокот е измерена со линијата на областа од тестот и присутноста или отсушноста на оваа линија покажува негативен или позитивен резултат на тестот. Колоидалните златни честички не се затворени во оваа област и тие се движат кон линијата на контролната област и се успешно затворени во одделот Ц за да формираат контролна линија без разлика на присутноста на HBsAg и anti-HCV. На крај линијата што ја формира оваа област реагира како контролна

²¹ www.biomerieux.com

направа, со тоа што покажува дека има доволно примероци во направата и примерокот е следен од точно движење.

Составен дел од пакетот

HBsAg или anti-HCV уред за тестирање, пластична пипета за една употреба, торбичка со силиконски гел како навлажнувач, шише со разредувач за процедурата на тестот.



Слика 12. Кит за тестирање
Figure 12. Test kit

Тестовите се чуваат на температура од +2 до +30 Целзиусови степени и не смее да се замрзнуваат. Под овие услови направата функционира стабилно сè до рокот на истек кој е втиснат на пакувањето.

Предупредувања и внимателност

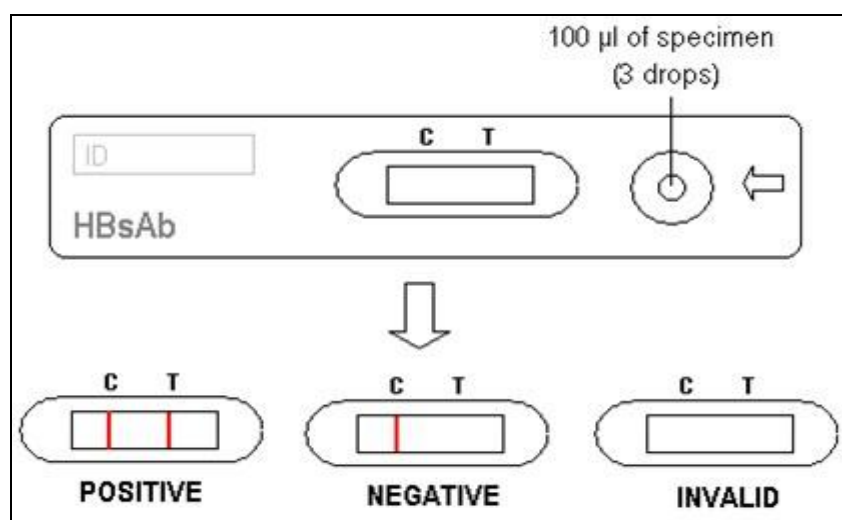
1. Направата за дијагностицирање е за еднократна употреба.
2. Никогаш не се замрзнуваат тестовите.
3. Доколку тестот се чува во фрижидер, почекајте продуктот да постигне собна температура пред употреба.
4. Тестот мора да се изведува на собна температура.
5. Тестот не смее да се употребува по рокот на истек.
6. Само човечка крвна плазма или серум можат да се употребуваат како примерок. Не се користи крв од папочната врвца бидејќи оваа крв го оневозможува движењето на колоидалните златни честички и може да даде неточни резултати.

7. Внимателно се набљудува бројот на капки. Само две до три капки мора да бидат капнати на тестот.
8. Откако ќе се извади тестот од пакувањето веднаш се употребува.
9. Доколку пакетот е продупчен напредната не смее да се користи.
10. Доколку земените примероци се замрзнати, тие не смеат повторно да се замрзнат откако ќе бидат одмрзнати.
11. Примероците од серумот или плазмата кои содржат големи количини на фибрин и еритроцити мора да бидат центрифугирани пред употреба.
12. Доколку контролната линија и линијата која се испитува се познаваат многу слабо, се разрежува примерокот во пропорција 1:10 со ПБС и се повторува тестот.
13. За да се превенира мешање помеѓу примероците се користат различни пипети за една употреба за секој тест.
14. За да се превенира контаминација мора да се користат ракавици за една употреба додека се работи со материјал кој може да содржи вируси за време на тестот. Посебна внимателност е потребна за да не дојде во контакт со потенцијално инфективен материјал со очите, јазикот и сл.
15. За време на изведување на тестот не смее да се користи козметика, не смеат да се консумираат течности и храна и не смее да се пуши.
16. Прскање и испарување за време на тестот не се дозволени.
17. Добивањето на точни резултати зависи од исполнување на протоколот на тестот. Тестот мора да биде извршен со точна количина и димензии, приспособена температура и тајминг за да можат резултатите да бидат веродостојни.
18. Сите чекори мора да бидат преземени по започнувањето на тестот.
19. Не се употребуваат примероци кои се хемолитични или липемични. Вакви примероци можат да дадат погрешни резултати.

Процедура

1. Тестот се изведува на собна температура.
2. Тест плочката е спакувана во ќесе.

3. Се капнуваат 2-3 капки од примерокот плазма или серум во вдлабнатината на тест плочката. Треба да се внимава да не настанат воздушни балончиња.
4. Резултатите од тестот може да се прочитаат за 10-20 минути.
5. Линиите кои се појавуваат по 20 минути не претставуваат доказ за дијагноза и таквите линии треба да се игнорираат.
6. Читањето на тестот е едноставно, доколку се обележи линијата на полето С тоа значи дека тестот е негативен. Доколку се обележат и двете линии на полињата С и Т тоа значи дека тестот е позитивен, а доколку нема обележување на двете линии ваквиот тест треба да се повтори уште еднаш.



Слика 13. Читање на тест
Figure 13. Reading a test

Примерок за тестирање

Како примерок за тестирање се користи свеж серум или плазма од човек.

Подготовка на примерок за тестирање

За да се добијат серумот или плазмата како примерок за тестирање, примерок од крвта се зема во сува и чиста епруветка, а потоа се одвојува серумот од примерок од крвта и се центрифугира 15 мин. на 5.000 вртежи на собна температура. Разделените серуми треба да се складираат на +2 степени

до +8 Целзиусови степени. Доколку примерокот не се искористи во следните три дена тогаш треба да се замрзне под -20 степени.

Специфичност

Специфичноста на тестот е дефинирана на 100%.

Тест ограничувања

Тестот не може да се користи само за дијагноза. Овој тест може само да се користи за прикажување присуство на HBsAg и anti-HCV. Евалуацијата на процесот и на резултатите мора да се врши од страна на стручно лице.

Крвта што ќе се користи не смее да се зема од секоја отворена рана или од друг орган со цел да се направи тестот валиден.

Тестот може да даде лажни резултати кај пациентите со автоимунно заболување на црниот дроб.

Тестот дава најдобри резултати при изведување на собна температура. Бидејќи примероците понекогаш се скоро одмрзнати многу пати може да вклучуваат и замрзнати парчиња кои можат да го блокираат тестот. Како резултат на ова примерокот не може да се движи слободно низ тест плочката и остава трага зад темната боја. Оттука ова прави резултатот од тестот тешко да се прочита.

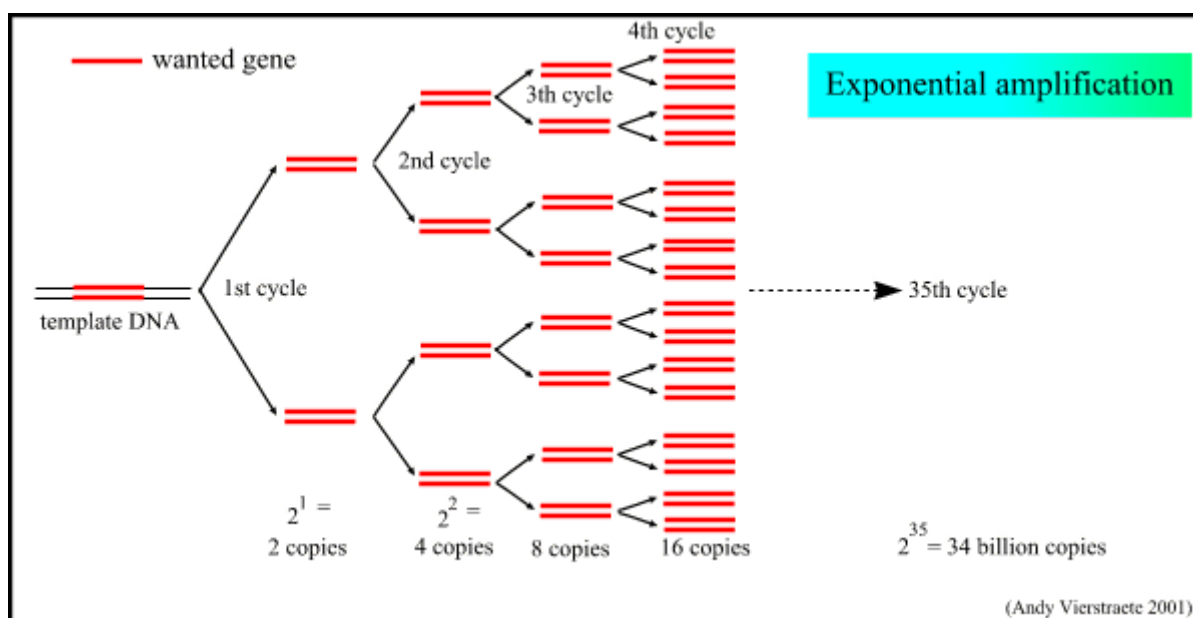
Капнување на повеќе капки од примерокот во празнината на тест плочката може да предизвика погрешни резултати.²²

Позитивните резултати добиени со помош на брзи тестови се потврдуваат со ELISA, PCR, Immulite.

²² Evaluating HBsAg rapid test performance for different biological samples from low and high infection rate settings & populations.

5. Полимераза верижна реакција (PCR)

Техника којашто најмногу се користи во молекуларната биологија е Полимераза верижната реакција (PCR). Оваа техника овозможува брза и едноставна *ин vitro* амплификација, односно умножување на ДНК секвенци од интерес. Со оваа техника само во рок од неколку часа од еден молекул на ДНК можат да се добијат милијарда идентични секвенци кои се нарекуваат ампликони. Вака добиените ампликони понатаму се визуализираат со електрофоретска техника. Електрофорезата најчесто е на агарозен или полиакриламиден гел.



Слика 14. Експоненцијално зголемување на таргет секвенцата при PCR
Figure 14. Exponential increasing the target sequence with PCR

Принцип на Полимераза верижна реакција (PCR)

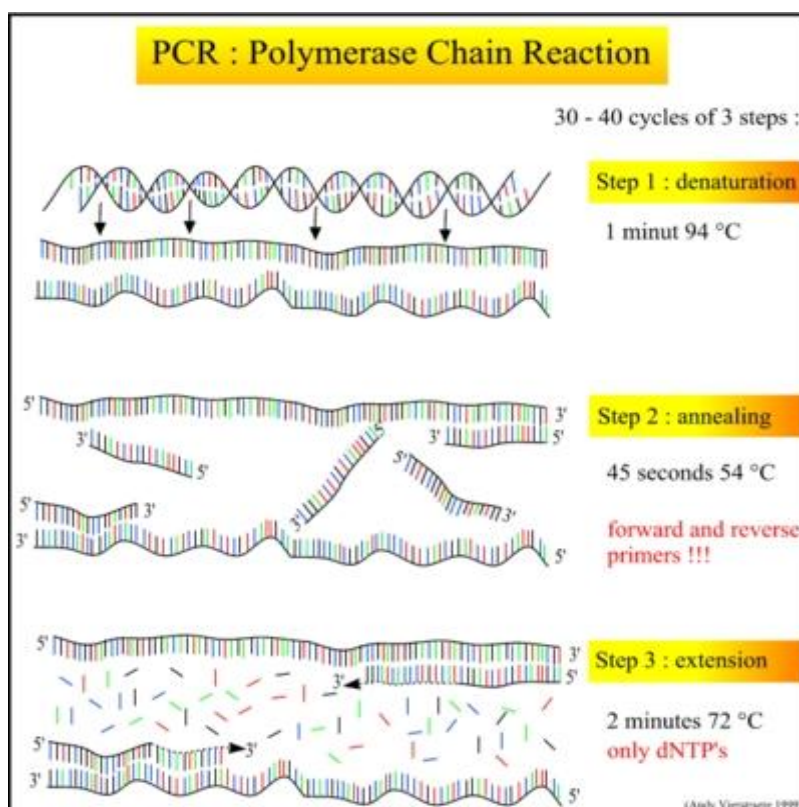
Полимераза верижната реакција се одвива во неколку чекори на различна температура во точно определени интервали. Еден PCR циклус се состои од три инкубациски чекори.

1. Првиот чекор е **денатурација**, кој се одвива на температура од 95°C . Изолираната ДНК под дејство на оваа температура од двоверижна ќе премине

во едноверижна, односно ќе дојде до раскинување на водородните врски и на тој начин ќе се добие едноверижна ДНК.

2. Вториот чекор е **врзување на прајмерите**. Овој чекор се одвива на температура од 50 до 65°C. Прајмерите кои претставуваат едноверижни олигонуклеотиди ќе се врзат за двата краја од фрагментот којшто ни е од интерес. Едниот прајмер кој уште е наречен преден прајмер ќе се врзе за горната верига на ДНК, односно со 3' крајот на горната верига, додека другиот, наречен реверзен ќе се врзе за 3' крајот на долната верига на ДНК.

3. Третиот чекор е **екстензија** на прајмерите кој се одвива на температура од 72°C. Екстензијата се врши со додавање на термостабилна Таq полимераза (која е изолирана од термостабилни бактерии) и со додавање на дезоксирибонуклеотиди, во насока 5'→3'. И на овој начин доаѓа до синтеза на нова верига која е комплементарна на веригата за која се врзани прајмерите.



Слика 15. Полимераза верижна реакција - анимација
Figure 15. Polymerase chain reaction - animation

Оптимизација на полимеразата верижна реакција

Успехот на реакцијата зависи од повеќе фактори:

1. Првиот фактор е правилен избор на сет од прајмери. Прајмерите треба да бидат со што помала разлика во нивната должина, односно од 18 до 22 нуклеотиди. Потоа да не бидат комплементарни помеѓу себе, ниту пак со другиот прајмер, посебно со 3' крајот, бидејќи ќе образуваат секундарни структури.
2. Вториот фактор е адекватно подесување на финалната концентрација на компонентите во реакциската смеса:
 - Најзначајна е концентрацијата на Mg^{2+} јоните. Тие се неопходни за активноста на Таq полимеразата, доколку се присутни во вишок може да доведат до намалување на специфичноста на реакцијата. Најчесто се во концентрација од 2 ммол.
 - Потоа концентрацијата на прајмерите треба да се движи од 0.1 до 0.5 μM , но најчесто во концентрација од 0.2 μM . Доколку се присутни во повисока концентрација ќе се добие неспецифичен резултат.
 - Дезоксирибонуклеотидите обично се во концентрација од 200 μM , повисоки концентрации може да ја инхибираат ензимската реакција преку врзување на магнезиумовите јони.
3. Големината и структурата на фрагментот што е предмет на амплификација се зависни од условите (температура, број на циклуси, должина на секој циклус) во кои најдобро би се одвивала реакцијата.
 - Температурата на анилирање зависи секогаш од температурата на прајмерот и од температурата на ампликонот. Доколку имаме температура која е повисока, во тој случај ќе се добие мал принос од PCR реакција, а доколку температурата е пониска тогаш може да се изгуби специфичноста на реакцијата.
 - Бројот на циклуси секогаш е правопрпорционален со приносот на реакцијата. Најчесто се изведуваат од 25 до 30 циклуси.
 - Големината на ампликонот влијае на времетраењето на чекорот на екстензија.

Визуализација на продуктите од стандардна PCR

Раздвојувањето и идентификацијата на ДНК се врши со помош на електрофореза. Електрофореза се врши на агарозен или полиакрил амиден гел. Тие се користат за квалитативна и семиквантитативна анализа, но исто така се користат и како техника за прочистување на одредена фракција на ДНК фрагменти.

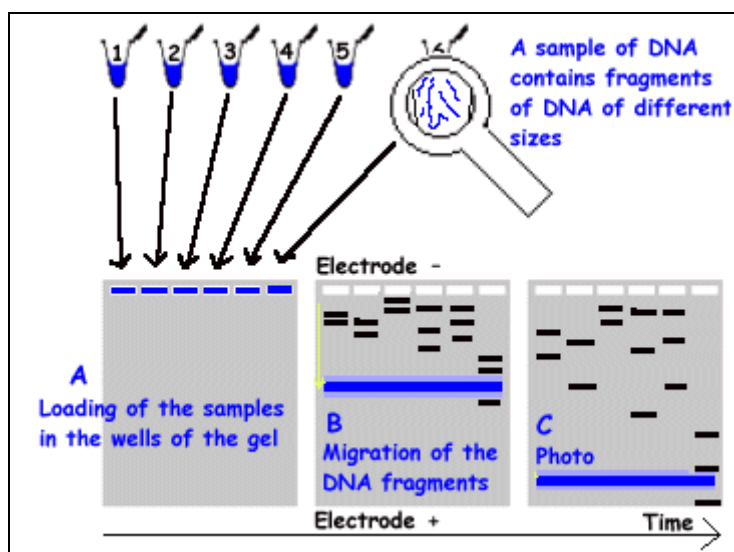
ДНК фрагментите имаат негативен полнеж во неутрална или слабо алкална средина, па заради тоа тие секогаш во електричното поле патуваат кон позитивната проба (анода). Фрагментите се движат со различна брзина. Етидиум бромид во контролирани услови овозможува правилно раздвојување и визуализација. Етидиум бромидот претставува флуоресцентна боја која интерхелира помеѓу базите на двоверижната ДНК и така овозможува визуализација под УВ светло. При електрофорезата, покрај примероците коишто се за анализа, се додава и ДНК маркер (ладер) кој е со позната должина со што се овозможува, со споредување, да се прочита непознатата должина на ДНК фрагментот од примероците.

Подвижноста на ДНК фрагментите при електрофореза е зависна од повеќе фактори:

1. Должината на фрагментите. Подолгите молекули секогаш патуваат побавно од покусите молекули.
2. Конформацијата на фрагментите. Молекулите коишто се со различна конформација патуваат со различна брзина.
3. Големината на порите на гелот. Помали пори ја олеснуваат сепарацијата на помалите фрагменти, и спротивно, поголеми пори овозможуваат раздвојување на поголеми фрагменти.
4. Интензитет на напон на електрично поле. Кога ќе се зголеми напонот ќе се зголеми и брзината на движење, но подолгите ДНК фрагменти добиваат поголемо забрзување од помалите ДНК фрагменти и во тој случај може да дојде до размачкување и со тоа ќе дојде до губење на резолуцијата во регионот на фрагментите со помала молекулска маса.
5. Состав на пуферот за електрофореза. Пуферите покрај тоа што овозможуваат оптимална pH вредност, тие обезбедуваат и јони за

одржување на спроводливоста. Од составот и јонската јачина на пуферот зависи електрофоретската подвижност на ДНК фрагментите.

6. Присуство на интерхалирачки супстанции. Поврзувањето на етидиум бромидот за ДНК фрагментите ќе ја промени нивната маса, а со тоа ќе се смени и нивното движење. Присуството на етидиум бромид во гелот ја намалува подвижноста за околу 15%.²³



Слика 16. Принцип на електрофореза
Figure 16. Electrophoresis principal

²³ Молекуларна биологија со генетика (практикум), Скопје, 2010, ас. Надица Матевска, ас. Александра Грозданова.

6. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Во трудот се прикажани податоци за вирусите хепатитис Б и хепатитис Ц за периодот од 2010 до 2015 година на територијата на Штип, нивно групирање по пол и возраст. Освен податоците во Штип, прикажани се и податоци за хепатитис Б и хепатитис Ц во Република Македонија.

Прикажани се графички и табеларно, бројот на заболени лица со хепатитис Б и хепатитис Ц, податоци добиени од Центарот за јавно здравје, Центарот за наркозависници, Казнено-поправниот дом и Центарот за дијализа во Штип.

Резултати за хепатитис Б

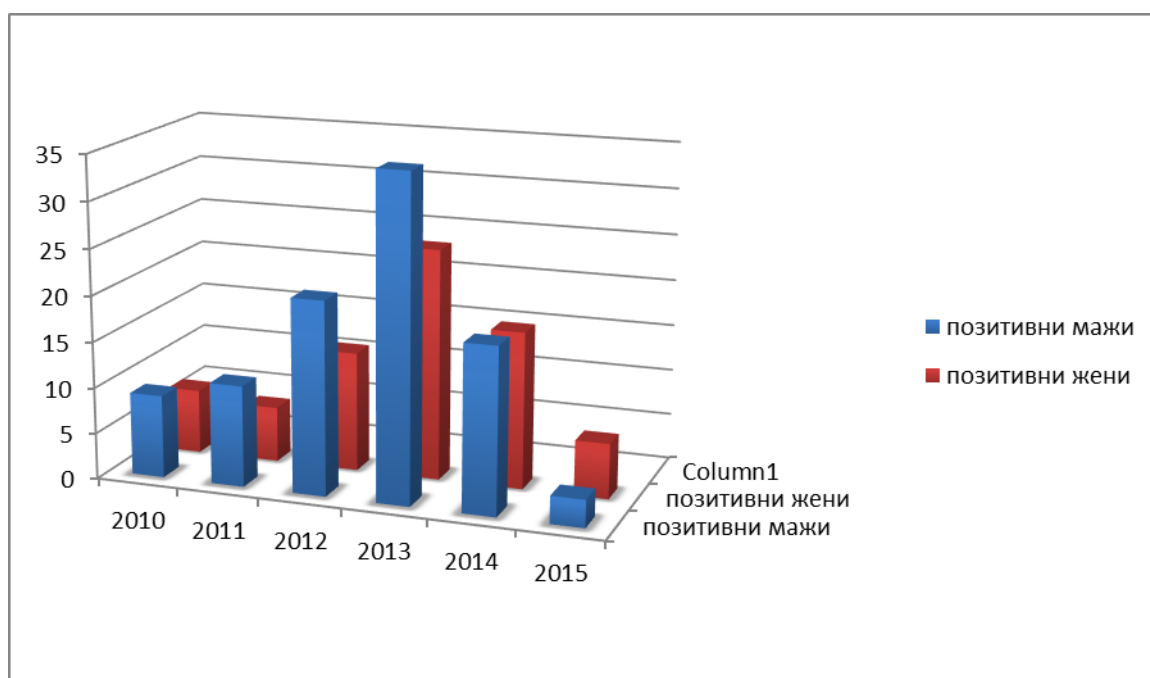
Табела 2. Број на испитаници на хепатитис Б во Штип од 2010 до 2015 г.
Table 2. Number of tested for hepatitis B in Stip from 2010 to 2015

Година	Вкупно	Мажи (+)	Жени (+)	Негативни
2010	357	9	7	341
2011	749	11	6	732
2012	659	21	13	625
2013	813	35	25	753
2014	1339	18	17	1304
2015	1232	3	6	1223
Вкупно	5149	97	74	4978

Табела 3. Број на позитивни испитаници на хепатитис Б според возраст
Table 3. Number of respondents of hepatitis B by age

ПОЗИТИВНИ	
0-15 год.	4
16-20 год.	5
21-50 год.	133
> 51 год.	29
ВКУПНО	171

Графикон 1. Позитивни мажи и жени на хепатитис Б во Штип од 2010 до 2015 г.
Graph 1. Positive male and female of hepatitis B in Stip 2010-2015



Графикон 2. Процент на позитивни лица на хепатитис Б според возраст
Chart 2. Percentage of positive cases of hepatitis B by age



Според прикажаните резултати за хепатитис Б може да се види дека во периодот од 2010 до 2015 г. во Центарот за јавно здравје во Штип се тестирани вкупно 5.149 испитаници од кои бројот на позитивни изнесува 171 (3%), а бројот на негативни испитаници е 4.978 (97%).

Бројот на позитивни машки лица е 97 (56,7%), а бројот на позитивни женски лица е 74 (43,3%). Може да се види дека бројот на позитивни мажи е поголем за разлика од бројот на позитивни жени. Најголем број на испитувања се направени во 2014 г., но бројот на позитивни е најголем во 2013 г. кога бројот на позитивни машки лица изнесува 35, а бројот на позитивни жени изнесува 25.

Според возраста, најголем процент на позитивни лица е на возраст од 21 до 50 години и изнесува вкупно 71% (133), најмал процент од 2% е кај испитаници од 0 до 15 години, но и најмал број на испитувања се направени кај оваа популација. Од прикажаните резултати може да се забележи дека секоја следна година бројот на испитувања значајно расте, пример бројот на

испитувања во 2010 г. изнесува 357, а додека бројот на испитувања направени во 2014 г. изнесува 1.339.

Табела 4. Број на наркозависници во Штип и број на позитивни и негативни на хепатитис Ц и хепатитис Б

Table 4. Number of drug addicts in Stip and the number of positive and negative for Hepatitis C and Hepatitis B

НАРКОЗАВИСНИЦИ				Наркозависници кои имаат хепатитис Б и хепатитис Ц
35				
МАЖИ		ЖЕНИ		
32		3		
Мажи		Жени		
Хепатитис Б	Хепатитис Ц	Хепатитис Б	Хепатитис Ц	
3	32	0	3	

Моменталната бројка на регистрирани наркозависници во Штип изнесува 38 и сите се тестирани на хепатитис Б и хепатитис Ц. Од 32 мажи позитивни на хепатитис Ц се 32, а на хепатитис Б и хепатитис Ц се 3. Само 3 се жени од кои сите 3 се заразени со хепатитис Ц. Бројот на наркозависници коишто немаат ниту хепатитис Ц ниту хепатитис Б е 3.

Резултати хепатитис Ц

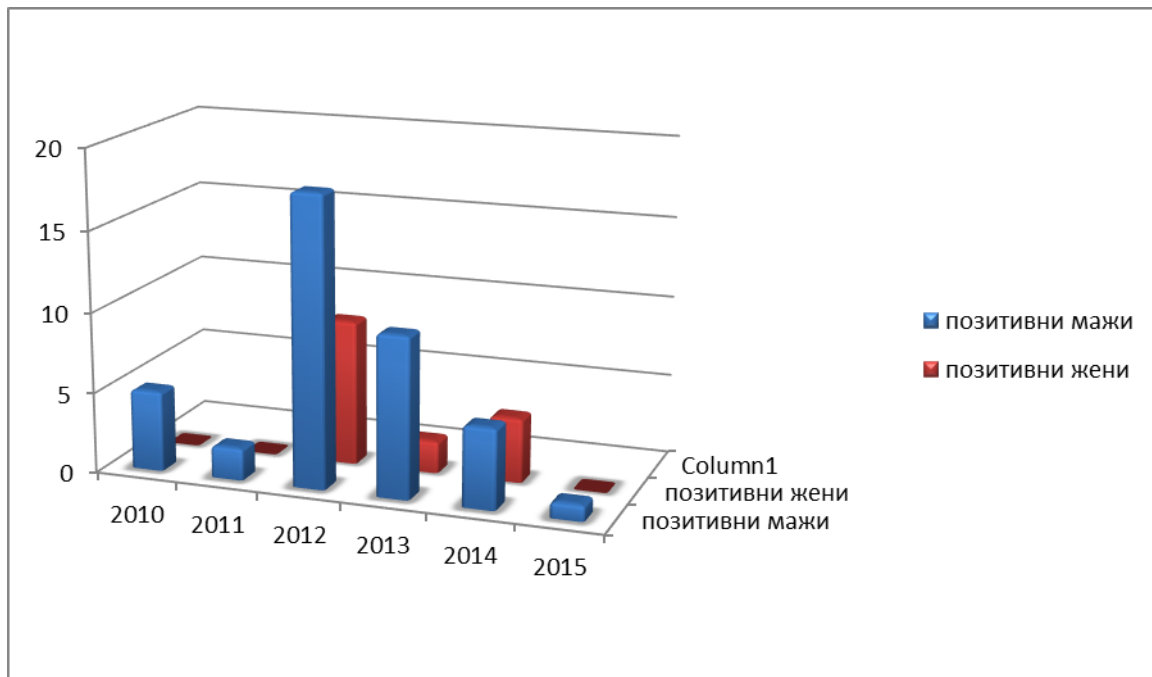
Табела 5. Број на испитаници на хепатитис Ц во Штип од 2010 до 2015 г.
Table 5. Number of tested for hepatitis C in Stip from 2010 to 2015

Година	Вкупно	Мажи	Жени	Негативни
2010	350	5	0	345
2011	405	2	0	403
2012	326	18	9	299
2013	450	10	2	438
2014	889	5	4	880
2015	832	1	0	831
Вкупно	3252	41	15	3196

Табела 6. Број на позитивни испитаници на хепатитис Ц според возраст
Table 6. Number of positive cases with Hepatitis C by age

ПОЗИТИВНИ	
0-15 год.	1
16-20 год.	0
21-50 год.	32
> 51 год.	23
ВКУПНО	56

Графикон 3. Позитивни мажи и жени на хепатитис Ц во Штип од 2010 до 2015 г.
Graph 3. Positive men and women of hepatitis C in Stip 2010-2015



Графикон 4. Позитивни мажи и жени на хепатитис Ц во Штип според возраст
Chart 4. Positive men and women of hepatitis C in Stip by age



Според прикажаните резултати во табела број 4 може да се види дека вкупниот број на лица коишто се испитувале на хепатитис Ц е 3.252, бројот на позитивни испитаници на хепатитис Ц во Штип во периодот од 2010 до 2015 г. е вкупно 56 (1,7%), а бројот на негативни е 3.196 (98,3%), бројот на позитивни мажи е поголем од бројот на позитивни жени и тоа 41 спрема 15 позитивни жени. Додека според табела број 5 може да се заклучи дека најголем број на позитивни лица е на возраст од 21 до 50 години, бројот е 32 или 57%, а најмал односно 0 е на возрасна граница од 16 до 20 години 41% е на возраст од над 51 година.

Табела 6. Број на хепатитис Ц позитивни лица во Казнено-поправен дом во Штип

Table 6. Number of positive with hepatitis C in penitentiary

ЗАТВОРЕНИЦИ ВО КПД ВО ШТИП	
350	
ПОЗИТИВНИ НА ХЕПАТИТИС Ц	НЕГАТИВНИ НА ХЕПАТИТИС Ц
35	315

Бројот на лица заразени со хепатитис Ц во Казнено-поправен дом во Штип според табела број 6 е 35 од вкупно 315 затвореници или 10%.

Табела 7. Број на лица со хепатитис Б и хепатитис Ц во Р. Македонија во период од 2011 до 2015 г.

Table 7. Number of cases with Hepatitis B and Hepatitis C in the Republic of Macedonia during the period from 2011 to 2015

	2011	2012	2013	2014	2015	Вкупно
Хепатитис Б	170	170	216	172	122	850
Хепатитис Ц	106	159	80	74	64	483

Според табела број 7 бројот на заболени лица со хепатитис Б вирусна инфекција е вкупно 850. Бројот е најголем во 2013 г. кога бројот изнесувал 216, а најмал односно 170 е во 2011 и 2012 година. Бројот на лица регистрирани со вирусен хепатитис Ц во Република Македонија во периодот од 2011 до 2015 г. е вкупно 483, најголем е бројот на регистрирани во 2012 г. и изнесува 159, а најмал односно 64 е во 2015 година.

Табела 8. Број на лица со хепатитис Б и хепатитис Ц во Штип во Центарот за дијализа во 2016 година

Table 8. Number of cases with Hepatitis B and Hepatitis C in Sthip, Centre for dialysis, in 2016

БРОЈ НА ЛИЦА ВО ЦЕНТАРОТ ЗА ДИЈАЛИЗА ВО ШТИП ВО 2016			
	Заболени од хепатитис Б	Заболени од хепатитис Ц	Немаат хепатитис Б и Ц
МАЖИ	9	9	7
ЖЕНИ	9	9	8
ВКУПНО	18	18	15

Бројот на лица регистрирани во Центарот за дијализа во Штип изнесува 33. Од нив мажи се 17, а жени се 16. Вкупната бројка на лица кои се заболени од вирусот на хепатитис Б изнесува 18, исто толку изнесува и бројката на лица кои се заболени од хепатитис Ц. Бројот на лица коишто немаат ниту хепатитис Б ниту хепатитис Ц е вкупно 15, мажи 7 и жени 8.

7. ЗАКЛУЧОК

- Хепатитис Б вирусот (ХБВ, HBV) е ДНК вирус кој ѝ припаѓа на фамилијата *Hepadnaviridae*. Се пренесува парентерално преку контакт со крв, други секрети и екскрети, трансфузија, игли кај i.v. наркозависници, тетоважи, пирсинг, секс/сперма, од мајка на дете.
- Инкубацијата е 2 до 6 месеци.
- ХБВ кај луѓето причинува *хепатитис Б*, тешко заболување на црниот дроб кое се јавува во акутна и хронична форма. Често хроничното заболување преминува во цироза или хепатоцелуларен карцином.
- Бројот на хронично инфицирани луѓе во светот изнесува околу 240 милиони, а годишно умираат 1-2 милиони луѓе.
- Постои вакцина која во Република Македонија е задолжителна од 2004 за сите новороденчиња.
- Хепатитис Ц вирусот (ХЦВ, HCV) е РНК вирус кој му припаѓа на семејството *Flaviviridae*. Се пренесува преку директен контакт со крв и други телесни течности, при трансфузии, секс, кај i.v. наркозависници, хемодијализа, од мајка на дете.
- Инкубацијата е 5 до 10 недели.
- Болеста кај 50% од пациентите преминува во хроничен активен хепатитис кој прогредира во цироза и хепатоцелуларен карцином.
- Во светот, 150 до 200 милиони луѓе се инфицирани со *HCV*.
- Не постои вакцина против хепатитис Ц.
- Лабораториската дијагноза на ХБВ и ХЦВ е можна со:
 - Серолошки испитувања со ELISA (директна детекција на антигени или индиректна детекција на антитела);
 - Имунохроматографски (брзи тестови);
 - Молекуларни методи: квалитативна и квантитативна ХБВ или ХЦВ детекција со PCR.
- Во Р. Македонија во периодот 2011 – 2015 година се регистрирани 850 заболени со хепатитис Б и 483 заболени со хепатитис Ц.
- Во анализите на овој труд се вклучени испитувања за периодот 2010-2015 година. Направени се испитувања за 5.149 за хепатитис Б и 3.252 за хепатитис Ц за лица испитувани во Центарот за јавно здравје во

Штип, 35 испитаници од Центарот за наркозависници, 350 испитаници од Казнено-поправниот дом и 33 испитаници од Центарот за дијализа во Штип.

- Тестирањата се спроведени прво со брзи тестови како скрининг, а како потврден тест е користена ELFA техника на апаратот VIDAS.
- Од вкупно 5.149 испитаници за хепатитис Б бројот на позитивни изнесува 171 (3%), а бројот на негативни испитаници е 4.978 (97%).
 - Бројот на позитивни машки лица е 97 (56,7%), а бројот на позитивни женски лица е 74 (43,3%).
 - Според возраста, најголем процент на позитивни лица е на возраст од 21 до 50 години и изнесува вкупно 71% (133).
- Вкупно 38 наркозависници во Штип се тестирани на хепатитис Б и хепатитис Ц. Од 32 мажи позитивни на хепатитис Ц се 32, а на хепатитис Б и хепатитис Ц истовремено позитивни се 3 лица. Само 3 се жени, од кои сите 3 се заразени со хепатитис Ц. Бројот на наркозависници коишто немаат ниту хепатитис Ц, ниту хепатитис Б е 3.
- Од 3.252 број на лица коишто се испитувале на хепатитис Ц, бројот на позитивни е 56 (1,7%), а бројот на негативни е 3.196 (98,3%), од кои позитивни мажи биле 41, а жени 15.
- Најголем број на позитивни лица е на возраст од 21 до 50 години (32 или 57%), а најмал односно 0 е на возрасна граница од 16 до 20 години, а на возраст од над 51 година 41%.
- Бројот на лица заразени со хепатитис Ц во Казнено-поправен дом во Штип е 35 од вкупно 315 затвореници или 10%.
- Бројот на лица регистрирани во Центарот за дијализа во Штип изнесува 33 (17 мажи и 16 жени). Позитивни за хепатитис Б се 18 и исто толку и за хепатитис Ц. Негативни наоди за хепатитис Б и хепатитис Ц имало кај 15 лица (7 мажи и 8 жени).
- Инциденцата на хепатитис Б и хепатитис Ц во Штип во испитуваните ризични групи е на ниво на инциденцата во Р. Македонија.
- Од огромна важност е примена на современи дијагностички методи и едукацијата на ризичните групи и персоналот (медицински и

немедицински) кој работи со овие луѓе за нивна заштита и поголема контрола во превенцијата и ширењето на овие тешки заболувања.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Инфективни болести, Љубомир Ивановски, 2007, 397-405
2. Medical Microbiology, D.Greenwood, R.Slack, J.Peutherer, M.Barer, 2010, 446-448
3. Медицинска микробиологија и паразитологија, спец. дел Вирусологија, Никола Пановски, Елена Трајковска-Докиќ, 2008, 248
4. Интерна медицина, том 1, проф. д-р Владимир Серафимоски, Скопје, 2003, 731
5. Инфектологија со епидемиологија, 2004, проф. д-р Илија Трајков -167
6. Management of Patient with Viral Hepatitis Patrick Marcelin, September 2004, Paris, France
7. <http://www.hepb.org/>
8. <http://www.nvohepta.mk/>
9. <http://www.genicalab.com/>
10. Hepatitis C virusna infekcija- virusoloski I patofizioloski aspekt - Dobrila Stankovic, Marica Otasevic, Gordana Tasic, Marina Dinic i Biljana Miljkovic-Selimovic, декември 2001, 44-45
11. Vodic za hepatit B I C, Mehmed Gribajčević Zora Vukobrat-Bijedić Nadir Lačević
12. Regina, et al., 1995; Fields and Knippe, 1996
13. Prim. dr. M. Ferhatović, prim. dr. N. Bajramović, dr. R. Gojak
14. Dijagnoza I terapija hronicne hepatits C virusne (HCV) Infekcije-Beograd, Prof dr. Neda Švrtlih Doc. dr. Miodrag Krstić, juni.2003
15. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. Hepatology 2013; 57:1333
16. <http://www.hepactive.org/>
17. <http://genicalab.com/>
18. World Health Organization. Hepatitis B Immunization:2001
19. Prince AM, Brotman B, Lee D-H, et al. Protection against chronic hepatitis C virus infection after rechallenge with homologous, but not heterologous, genotypes in a chimpanzee model. J Infect Dis 2005;192:1701–9)
20. Praćenje liječenih i neličenih bolesnika s virusnim hepatitisom - V. Čolić-Cvrlje, R. Ostojić, Acta Med Croatica, 67 (2013) 345-349
21. www.biomerieux.com
22. Evaluating HBsAg rapid test performance for different biological samples from low and high infection rate settings & populations
23. Молекуларна биологија со генетика (практикум), Скопје, ас. Надица Матевска, ас. Александра Грозданова, 2010